

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Rakku sisenevatel peptiididel põhineva mikroRNA transfektsioonimeetodi arendamine

Bakalaureusetöö

12 EAP

Karolina Laas-Dobrev

Juhendajad MSc Helen Hermann

MSc Toomas Runnel

PhD Toivo Maimets

TARTU 2018

Rakku sisenevatel peptiididel põhineva mikroRNA transfektsioonimeetodi arendamine

Rakku sisenevad peptiidid on membraane läbivad ühendid, millel on tõestatud võime viia erinevatesse rakuliinidesse terapeutilisi molekule. MikroRNA-d on lühikesed mittekodeerivad endogeensed RNA-d, mis paarduvad mRNA-dega ning reguleerivad nende stabiilsust ja translatsiooni valkudeks või suunavad need lagundamisele. Käesoleva töö käigus katsetati laialt levinud kaheaahelaliste mikroRNA miimide keratinotsüütidesse viimise kõrval ka üheaahelaliste miimide rakkudesse viimist ning hinnati nende toimimist rakkudes. Kaheaahelalisi miime viidi rakkudesse mitmete erinevate peptiididega, millest vaid ühte oli varasemalt kasutatud mikroRNA-de transpordiks.

Märksõnad: rakku sisenevad peptiidid, mikroRNA, miR-146a, mikroRNA miimid

CERCS: B210 Histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Developing of the microRNA transfection method based on cell penetrating peptides

Cell penetrating peptides are molecules that have the ability to transport therapeutic molecules into different cell types. MicroRNAs are short non-coding endogenous RNAs that bind with complementary mRNAs and regulate their stability and translation into proteins. In this given bachelor's thesis, cell penetrating peptides were used to deliver both single stranded and double stranded microRNA mimics into keratinocytes and evaluated their functionality. Double stranded mimics were transported into cells with different cell penetrating peptides, only one of which had been previously used to transport microRNAs.

Keywords: cell penetrating peptides, microRNA, miR-146a, microRNA mimics

CERCS: B210 histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

Sisukord

Kasutatud lühendid	4
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	7
1.1 Ühendite rakku transportimise viisid ja RNA transfektsioon.....	7
1.1.1 Ühendite rakku transportimine	7
1.1.2 Viiruslikud ning mitteviiruslikud transpordiviisid	7
1.1.3 Sünteetilised vektorid	8
1.2 Rakku sisenevad peptiidid	9
1.3 MikroRNA-d ja nende biogenees	13
1.4 MiR-146a funktsioon.....	15
1.5 MikroRNA miimid	18
1.6 UNA.....	19
2. EKSPERIMENTAALOSA	20
2.1 Töö eesmärgid.....	20
2.2 Materjal ja metoodika	20
2.1.1 Rakkude kasvatamine ja paljundamine	20
2.1.2 Transfektsioon erinevate peptiididega	20
2.1.3 Transfektsioon erinevate mikroRNA miimidega.....	21
2.1.4 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütides.....	23
2.1.5 RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks	23
2.1.6 RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks	24
2.1.7 Statistiline analüüs	25
2.3 TULEMUSED	26
2.3.1 Erinevad rakku sisenevad peptiidid on võimelised keratinotsüütidesse efektiivselt sisenema	26
2.3.2 Üheaahelised miR-146a miimid sisenevad keratinotsüütidesse, kuid ei ole funktsionaalsed	27
2.3.2 MikroRNA ja peptiidi suhte muutmine ei parandanud üheaaheliste miimide funktsionaalsust	30
2.3.3 Üheaaheliste miR-146a miimide kokkusegamisel saadud kaheaahelised miimid on keratinotsüütides funktsionaalsed.....	32
2.4 ARUTELU.....	34
TÄNUSÕNAD	41
KASUTATUD KIRJANDUS.....	42
Kasutatud veebiaadressid.....	50
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	51

Kasutatud lühendid

AGO- Argonaut (*Argonaute*)

CARD10- *caspase recruitment domain-containing protein 10*

CCL5- *C-C motif chemokine*

Ct- lävitsükkel (*threshold cycle*)

CXCL5- *C-X-C motif chemokine 5*

DCGR8- DiGeorge sündroomi kriitiline regioon geen 8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*)

DOTMA- N-[1-(2,3-dioleüloksü)propüül]-N,N, N-trime-tüülammonium kloriid (*N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N, N-trime-thylammonium chloride*)

EDTA- etüleendiamiintetraatsetaat (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EF1A- elongatsioonifaktor 1-alfa (*elongation factor 1-alpha*)

EGFR- (*epidermal growth factor receptor*)

FERMT1- (*fermitin family homolog 1*)

IL-8- interleukiin-8 (*interleukin*)

IRAK1- *interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

LNA- *locked nucleic acid*

miR, miRNA- mikroRNA (*microRNA*)

miRISC- mikro-RNA indutseeritud vaigistav kompleks (*micro-RNA induced silencing complex*)

mRNA- informatsiooni-RNA (*messenger-RNA*)

ncRNA- mittekodeeriv RNA (*non-coding RNA*)

NF- NickFect

NF-κB- tuumafaktor κB (*Nuclear factor kappa B*)

NHEK- normaalsed inimese epidermaalsed keratinotsüüdid (*normal human epidermal keratinocytes*)

PBS- füsioloogiline lahus fosfaatpuhvrts (*phosphate-buffered saline*)

pDNA- plasmiidne DNA (*plasmid DNA*)

PF- PepFect

pre-miRNA- prekursor miRNA (*precursor miRNA*)

pri-miRNA- primaarne miRNA (*primary miRNA*)

RSP- rakku sisenev peptiid (*cell penetrating peptide*)

RT-qPCR- pöördtranskriptsiooni kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

SEM – standardviga (*standard error of the mean*)

SFM- seerumivaba sööde (*serum-free medium*)

siRNA- väike interfereeriv RNA (*small interfering RNA*)

STAT1- *signal transducer and activator of transcription 1*

TP10- Transportaan 10 (*Transportan 10*)

TRAF6- *TNF receptor-associated factor 6*

UNA- *unlocked nucleic acid*

UTR- transleerimata piirkond (*untranslated region*)

XPO5- Eksportiin 5 (*Exportin 5*)

Sissejuhatus

Erinevate ühendite, kaasaarvatud nukleiinhapete viimiseks rakkudesse on kasutatud mitmeid viise. Üks paljulubavamaid tehnoloogiaid põhineb rakku sisenevatel peptiididel. Rakku sisenevad peptiidid on kuni 30 aminohappe pikkused peptiidid, mis suudavad edukalt kanda rakkudesse erinevaid molekule (Milletti, 2012; Crombez, 2009). Neid kasutatakse oligonukleotiidide, peptiidide, valkude ning väiksemate ravimite transpordiks rakkudesse (Stewart, 2008; Langel ja Järver, 2004). Rakku sisenevate peptiidide olulisus seisneb suuresti ka nende ohutuses- nad on madala tsütotoksilisusega ning ei lõhu rakke (Langel ja Järver, 2004).

MikroRNA-d on lühikesed, 21-23 nukleotiidi pikkused mittekodeerivad RNA-d (Lau jt, 2001). MikroRNA-d seonduvad mRNA-dega ja reguleerivad nende stabiilsust ja translatsiooni valkudeks (He ja Hannon, 2004; Li jt, 2017). MikroRNA-146a (miR-146a) on üks peamistest immuunsüsteemi mõjutavatest miRNA-dest. miR-146a on põletikuvastase toimega miRNA, mille põhiliseks ülesandeks on alla suruda immuunsüsteemi aktiveerimist, inhibeerides oma märklaudgeenide ekspressiooni (Meisgen jt, 2014). Samuti on näidatud, et see miRNA pärssib rakkude proliferatsiooni ning surub alla põletikuliste tsütokiinide tootmist (Rebane jt, 2014; Larjava jt, 2008).

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kindlaks teha, kas koostööpartnerite poolt sünteesitud modifitseeritud ühe- ja kaheahelalised miRNA miimid on funktsionaalsed ja seega sobivad edaspidises teadustöös ja arendustegevuses. Töös kasutatud miR-146a miimid sünteesiti Lõuna-Taani ülikooli laboris, mida juhib professor Jesper Wengel. Kõigepealt uuriti, kas üheahelalised mikroRNA miimid on võimelised asendama hetkel peamiselt kasutusel olevaid kaheahelalisi miime. Kontrolliti nii nende sisenemist rakku kui ka funktsionaalsust inimese primaarsetes keratinotsüütides. Lisaks üheahelalistele miimidele kasutati ka kaheahelalisi modifitseeritud miime. Eesmärgiks oli testida, kas disainitud kaheahelalised miimid on sama efektiivsed kui kommertsiaalsed kaheahelalised miimid. Bakalaureusetöö raames katsetati ka erinevaid peptiide miRNA miimide transpordiks keratinotsüütidesse.

Bakalaureusetöö valmis Tartu Ülikooli molekulaar- ja rakubioloogia instituudi geenitehnoloogia õppekava raames. Eksperimentaalosa sooritati Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudis, RNA bioloogia töörühmas.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Nukleiinhapete transfektsioon

1.1.1 DNA ja mRNA transfektsioon

Geneetilise materjali viimine sihtmärkrakkudesse on saanud asendamatuks abivahendiks geenide funktsiooni ja regulatsiooni uurimiseks. Kasvanud on ka vajadus vektorite järgi, mis suudaksid nukleiinhappeid transportida geeniteraapia arendamise eesmärgil imetajate rakkudesse (Langel ja Mäe, 2006), kuna modifitseerimata nukleiinhappe molekulid ei suuda iseseisvalt efektiivselt rakkudesse siseneda oma suuruse ja hüdrofiilsuse tõttu (Guterstam jt, 2009). Lisaks on nukleiinhapete jõudmine rakutuumale takistatud nii plasma- kui ka tuumamembraani ja lagundavate nukleaaaside poolt (Al Dosari ja Gao, 2009).

Pikka aega arvati, et informatsiooni kandev RNA ehk mRNA (messenger-RNA) on liiga ebastabiilne, et võimaldada tema kasutamist terapeutilise molekulina ning seetõttu eelistati geeniteraapias RNA-le plasmiidset DNA-d (pDNA-d) (Tavernier jt, 2010). Enne 1990. aastat avaldati mRNA viimisest rakkudesse vaid kaks tööd, kuid viimastel aastakümnetel tehtud avastused on näidanud, et mRNA transfektsioon on osutunud ootamatult kasulikumaks (Malone jt, 1989; Koch, 1973). Esiteks ei sisene RNA genoomi, hoides seega ära insertioonilised mutatsioonid. Samuti ei ole RNA transfektsiooni puhul takistavaks faktoriks tuumamembraan, mis pDNA rakku viimise puhul osutub raskesti läbistatavaks barjääriks (Tavernier et al, 2010).

1.1.2 Viiruslikud ning mitteviiruslikud transpordiviisid

Võimalikult efektiivse nukleiinhapete rakku viimise meetodi saavutamiseks on välja arendatud mitmeid viiruslikke ja mitteviiruslikke transpordiviise. Viirusvektoritel põhineva meetodi abil on saavutatud täpsem ning efektiivsem sisenemine rakkudesse ja pikaajalisem geeniekspressioon kui mitteviiruslike meetoditega (Villemeijane ja Mir, 2009). Katsetatud on näiteks retro-, adeno-, lenti-, rõuge- ning herpes-viirusi (Vannucci jt, 2013). Viiruslikud vektorid on osutunud mitmeti problemaatiliseks. Kliinilistel katsetel on esinenud mitmeid murettekitavaid kõrvaltoimeid, näiteks võimalus ägeda põletikulise immuunvastuse tekkeks ning mutagenees, mida põhjustab aluspaaride lisandumine genoomsele DNA-le. Samuti on

piiratud transgeeni suurus, mida viirusvektorid suudavad uude organismi kanda (Wang jt, 2013; Kaestner jt, 2015; Gao, 2007).

Mitteviiruslikke meetodeid on palju kasutatud just RNA transfektsioonil ning sellised geneetilise materjali transpordiviisid võib omakorda jaotada kaheks: meetodid, mis mõjutavad rakubarjääri füüsiliselt ning meetodid, mis kasutavad katioonseid kandjaid (lipo- ja polüpleksid). Füüsilised meetodid ei kasuta kandjaid, vaid ühendid viiakse rakku nõelatorke (Wolff jt, 1990), elektroporatsiooni (Heller jt, 2005), geenipüstoli (Yang ja Sun, 1995) või ultraheli (Lawrie jt, 2000) abil. Lihtsaim moodus on DNA süstimine otse koe sisse, millega kaasneb aga madal ja valimatu geeniekspressioon. Puudusi üritatakse järjest kõrvaldada: näiteks avastati 2006. aastal, et koesisese süstamise kiiruse tõstmine tähendab geeniülekanne efektiivsuse tõusu (André jt, 2006). Samuti on nii *in vivo* kui ka *in vitro* katsetel väga populaarne meetod elektroporatsioon, peamiselt oma lihtsuse ja tõhususe tõttu. Meetodi põhimõte seisneb elektrivälja poolt membraanile moodustatud väikestel pooridel, läbi mille saavad laetud osakesed rakku siseneda (Funahashi jt, 1999). Pooride sulgumiseks peab kasutatud elektrivälja tugevus ning kestvus olema täpselt õige. Kui poorid ei sulgu korrektselt, võivad rakud saada vigastada ja surra (Isaka ja Imai, 2007). RNA elektroporatsioon on mitmel põhjusel eelistatum kui pDNA elektroporatsioon. Esiteks on see vähem toksiline, kuna RNA peab läbima vaid rakumembraani, mitte raku- ja tuumamembraani, nagu pDNA. Samuti on RNA puhul saavutatud suurem tulemuslikkus, 89% rakkudest on katse lõpus transfekteeeritud, pDNA puhul on sama protsent vaid 40%. Lisaks mõjutab elektroporatsioon rakkude elulemust, näiteks suri katse käigus 51% pDNA-ga transefekteeeritud rakke ning 15% RNA-ga transfekteeeritud rakke (Tendeloo jt, 2001). Tihti ei ole füüsiliste meetodite kasutamine aga praktiline, kuna need nõuavad rakumembraani lõhestamist (Langel ja Järver, 2004).

1.1.3 Sünteetilised vektorid

Sünteetilisi vektoreid, mis sisaldavad kas katioonsete lipiidide ja nukleiinhappe kompleksi või katioonsete polümeeride ja nukleiinhappe kompleksi, nimetatakse vastavalt lipopleksideks või polüpleksideks (Tros de Ilarduya jt, 2010). Katioonsete lipiidide ja DNA kompleksi tutvustas esmalt grupp, kes kasutas N-[1-(2,3-dioleüloksü)propüül]-N,N,N-trime-tüülammonium kloriidi ehk DOTMA-t, et transfekteeerida DNA-d rakkudesse (Felgner jt, 1987). Lipopleksi morfoloogia määravad ära DNA ja katioonsete lipiidide füsiokeemilised omadused (Kreiss jt, 1999). Katioonsete lipoplekside struktuuri tõlgendamiseks on loodud kaks põhimõttelt erinevat mudelit. Esimeses, „välimises“ mudelis on DNA katioonsete liposoomide pinnale neeldunud.

Teises ehk „sisemises“ mudelis katab DNA-d lipiidne kest (Eastman jt, 1997). Üksikut plasmidi ümbritseb piisavalt katioonseid lipiide, et täielikult neutraliseerida DNA negatiivsed laengud. Need lipiidid moodustavad positiivselt laetud komplekse, mis seostuvad negatiivselt laetud rakkude membraanile. See seostumine on alus efektiivsele transfektsioonile (Felgner jt, 1987).

Keemilise transfektsioonimeetodi puhul on kandjavektorid sünteetilised (Wolff jt, 1990) ning vektorid vahendavad DNA transporti läbi membraani, kasutades kaltsiumfosfaati, polükatioone või dendrimeere (Kingston jt, 2001; Cho jt, 2003; Shcharbin jt, 2013). Transfektsioon kaltsiumfosfaadi abil on üks odavaimetest meetoditest. Selle abil saab transfekteerida kiirelt suurt hulka rakke, kuid transfektsiooni efektiivsus jääb üpriski madalaks (Kaestner jt, 2015). Väga efektiivseks peetakse veel katioonsetel lipiididel põhinevat lipofektsiooni. Võrreldes eeltoodud keemiliste transfektsioonimeetoditega, näidati lipofektsiooni puhul 5-100 korda efektiivsemat transfektsiooni (Kaestner jt, 2015). Katioonsete liposoomide kasutamisel seonduvad lipiidid DNA-ga ja viivad selle endotsütoosi teel sihtmärkrakku. Kuigi antud meetod on väga efektiivne, on sellel täheldatud ka negatiivseid aspekte. Esiteks kasutatakse transfektsioonil reagente nagu Lipofectamine, FuGene 6 ja Nanojuice, mille täpset keemilist koostist teavad vaid tootjad (Kaestner jt, 2015) ning teiseks ei toimi DNA ülekanne lipofektsiooni abil nendesse rakkudes, mis on juba lõplikult diferentseerunud, näiteks täiskasvanud südame müotsüütidesse (El-Armouche jt, 2007, Kaestner jt, 2014).

1.2 Rakku sisenevad peptiidid

Paljulubav klass membraane läbivad ühendeid on rakku sisenevad peptiidid (RSP-d). Esimesena, 1988. aastal, avastati rekombinantse Tat valgu võime liikuda läbi rakumembraani ja otse tuuma (Frankel ja Pabo, 1988). Järgmisena leiti, et närvirakkudes suudab liikuda äädikakärbsse antennapedia homeodomeen, mis koosneb 60 aminohappest (Joliot jt, 1991). Esimene RSP eraldati aastal 1994, selleks oli 16 aminohappest koosnev pAntennapedia ehk pAntp, tänapäeval tuntud ka penetratiinina. Penetratiin pärineb antennapedia homeodomeeni järjestusest (Derossi, 1994). Penetratiin ja Tat peptiid on näited looduslikult esinevatest RSP-dest (Langel ja Mäe, 2006). Esineb veel kimmäärseid RSP-sid nagu transportaan ning sünteetilisi peptiide, näiteks polüarginiinid (Langel ja Mäe, 2006).

RSP-d on üpris lühikesed, mitte üle 30 aminohappe pikkused peptiidid, enamik neist on katioonsed ja hüdrofiilsed. Suurem osa RSP-sid koosnevad samadest peamistest aminohapetest

(näiteks arginiin, lüsiin, trüptofaan ja proliin (Milletti, 2012)) ning on füsioloogilise pH väärtuse juures positiivselt laetud. Füüsikalis-keemilised omadused on RSP-del erinevad, mistõttu seostuvad erinevad RSP-d erinevat tüüpi rakupinna retseptoritele (Ziegler, 2008). Nende võimet kanda erinevaid molekule edukalt rakkudesse on tõestatud nii koekultuuri (*in vitro*) kui ka *in vivo* katsetes (Crombez jt, 2009). Efektiivsusest on need võrreldavad viirusvektoritega, kuid nad on ohutumad; ei lõhu rakku ning neil on madalam tsütotoksilisus (Langel ja Järver, 2004).

RSP-sid saab grupeerida mitmete omaduste alusel, näiteks päritolu või aminohappelise järjestuse põhjal (Koren ja Torchilin, 2012). Üks levinumaid peptiidide jaotusviise on füüsikalis-keemiliste omaduste põhjal jagatult kolmeks: katioonsed, amfipaatsed ja hüdfoobsed RSP-d. Katioonsetel peptiididel on kõrge positiivne kogulaeng ja vähe happelisi aminohappejääke (Wang jt, 2014). Uurides näiteks arginiinil põhinevaid peptiide, leiti, et geneetilise materjali ülekandmiseks peab minimaalne järjestus olema oktaarginiin. Arginiinide arvu suurendamisel suurenes ka ülekande efektiivsus (Tünnemann jt, 2008). Ka mitmete teiste aminohapete puhul arvatakse, et ülekandeks on vaja vähemalt kaheksat positiivset laengut (Futaki jt, 2001). Algselt arvati, et katioonsed RSP-d suudavad siseneda rakkudesse, kutsumata esile rakulisi vastuseid. Praeguseks on aga teada mitmeid RSP-de rakku sisenemisega kaasnevaid kõrvalnähtusid, nagu näiteks rakumembraani vastupidavuse ja raku elujõulisuse vähenemine (Wang jt, 2014).

Amfipaatsed peptiidid sisaldavad nii polaarseid kui ka mittepolaarseid alasid. Arvatakse, et amfipaatsus on tekkinud nende peptiidide primaarstruktuurist (Wang jt, 2014). Amfipaatsed peptiidid saab omakorda jagada kaheks: primaarseteks ja sekundaarseteks. Mõlemat tüüpi amfipaatsed peptiidid võivad olla nii kimäärsed kui ka looduslikest valkudest eraldatud (Oglecka jt, 2008). Primaarsed amfipaatsed koosnevad rohkem kui 20 aminohappejäägist ning järjestikku vahelduvad hüdfoobsed ja katioonsed domeenid. Teine klass, sekundaarsed amfipaatsed, on lühemad, vaja on vähem kui nelja heeliksi pööret (Milletti, 2012). Seondudes membraaniga, moodustub sekundaarsete amfipaatsede peptiidide sekundaarstruktuuris beeta-lehe või alfa-heeliksi konformatsioon (Ziegler, 2008). Alfa-helikaalsetel peptiididel asub molekuli ühel poolel hüdfoobne osa, teisel aga katioonne, anioonne või polaarne. Beeta-lehe struktuuriga peptiididel vahelduvad hüdfoobne ja hüdofiilne piirkond (Wang jt, 2014). 2009 aastal sünteesiti esimene alfa-helikaalne sekundaarne amfipaatsne peptiid CADY, mis moodustab stabiilseid komplekse siRNA-dega. Rakumembraaniga seondudes omandab CADY helikaalse konformatsiooni, mille stabiliseerimiseks asuvad laetud aminohappejäägid ühel

poolel ning trüptofaani jäägid, mis aitavad kaasa rakku sisenemisele, teisel poolel (Crombez jt 2009).

Hüdrofoobsete peptiidide all peetakse silmas peptiide, mis koosnevad mittepolaarsetest aminohappejääkidest. Erinevalt katioonsetest ja amfipaatsetest, ei mõjuta aminohappelise järjestuse muutmine hüdrofoobsete peptiidide efektiivsust rakku sisenemisel (Milletti, 2012). Selliseid RSP-sid on praeguseni avastatud vähe, tuntumad on integriin $\beta 3$ ja Karposi sarkoomi fibroblastide kasvufaktor (Watkins jt, 2009). Hüdrofoobsed aminohapped pole aga ainult hüdrofoobsete peptiidide koostises, neid leidub ka amfipaatsetes ning vähemal määral kimäärsetes peptiidides (Wang jt, 2004).

Rakku sisenevad peptiidid on praeguseks saanud usaldusväärseks transpordisüsteemiks mitmetele bioaktiivsetele molekulidele nagu peptiidid, oligonukleotiidid ja mitmed valgud (Langel ja Järver, 2004). Samuti on RSP-d olnud abiks ravieesmärkidel rakku viidavate ühendite, nagu antisense oligonukleotiidide ning mitmete väiksemate väljatöötatud ravimite transpordil (Stewart, 2008).

1.2.1 PepFect14 (PF14)

PF14 eellaseks on hüdrofoobne rakku sisenev peptiid Transportaan 10 (TP10), mis saadi, kui toksiliste kõrvalmõjudega amfipaatse Transportaani N-terminaalsest otsast eemaldati kuus aminohapet (Madani jt, 2011, Yandek jt, 2007). Stearüülitud TP10 on tuntud kui PepFect3 peptiid, mis kompleksis splaissingut korrigeerivate oligonukleotiididega (SCO) viib eduka splaissingu korrektsioonini *in vitro* mudelites (Mäe jt, 2009). PepFect3-st arendati analoog PepFect14 (PF14), kus muudeti lüsiinid ornitiinideks, lisati üks laeng ning stearüülhappe modifikatsioon jäeti sisse. PF14 suudab efektiivselt rakku viia nii oligonukleotiide, siRNA-t kui ka pDNA-d ning teda kasutatakse edukalt splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide transpordil (Lehto jt, 2017, Ezzat jt, 2011, van Asbeck jt, 2013). Samuti on PF14 abil edukalt viidud PPC-1 (*human primary prostate carcinoma-1*) rakkudesse ka mikroRNA miime (Urgard jt, 2017).

1.2.2 NickFect 55 ja NickFect70 (NF55 ja NF70)

NickFectid (NF) on samuti arendatud PepFect3 põhjal ning neid on kasutatud erinevate rakuliinide transfekterimisel pDNA, siRNA ja splaissingut korrigeerivate oligonukleotiididega (Arukuusk jt, 2013). Algselt näisid erinevatel põhjustel edukaimad NF-id olevat NF1 ning NF51. Teadaolevalt soodustab NF51 DNA pakkimist homogeenseteks ja stabiilseteks nanopartikliteks ning võimaldab nende nanopartiklite eemaldumist endosoomidest paremini kui NF1. NF1 puhul aga arvati, et selle selgroos olev negatiivselt laetud fosforüülrühm võimendab transfektsiooni edukust. Nende kasulike omaduste kombineerimiseks sünteesiti NF1 ja NF51 baasil NF55, mille järjestus on toodud joonisel 1 (Arukuusk jt, 2015, Oskolkov jt, 2011, Freimann jt, 2016). NF55 on väiksema kogulaenguga, kui tema eellased. *In vitro* pDNA transfektsioon näitas, et selline analoog on efektiivne, põhjustades NF51-st kaks korda kõrgema geeniekspressiooni (Freimann jt, 2016). Kuna NF70 järjestus on publitseerimata, siis antud peptiidi lähemalt ei kirjeldata.

NF55 (Stearüül-AGYLLG) δ -OINLKALAALAKAIL-NH₂

Joonis 1. Rakku siseneva peptiidi NF55 järjestus. Modifitseeritud Freimann jt, 2016 järgi.

1.2.3 C-12-14 ja C-22-14

Peptiidid C-12-14 ja C-22-14 on modifitseeritud PF14 analoogid, mis saadi lisades PF14 ahela selgroole küllastunud lineaarseid atsüülahelaid süsinike arvuga vastavalt 12 ja 22. Kõikide eelpool maintud peptiidi järjestused on toodud joonisel 2. Transfektsiooni efektiivsust kinnitati mittekovalentse peptiidi ja splaissingut korrigeeriva oligonukleotiidi kompleksi moodustamisega, mis viidi HeLa pLuc705 rakuliini rakkudesse. On näidatud, et N-terminaalse osa hüdrofoobsuse tõstmine läbi atsetüleerimise suurendab oligonukleotiidide funktsionaalset transporti võrdeliselt atsüülahela pikkusega alates 12 süsinikuga peptiidist. Efekti põhjuseks võib olla peptiidide/oligonukleotiidide komplekside tugevam seondumine rakkude plasmamembraanile (Lehto jt, 2017).

PF14 Stearüül-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL
 C-12-14 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{10}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-CONH}_2$
 C-22-14 $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{20}\text{-CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-CONH}_2$

Joonis 2. Rakku sisenevate peptiidide PF14, C12-14 ja C22-14 järjestused. Modifitseeritud Lehto jt, 2017 järgi.

1.3 MikroRNA-d ja nende biogenees

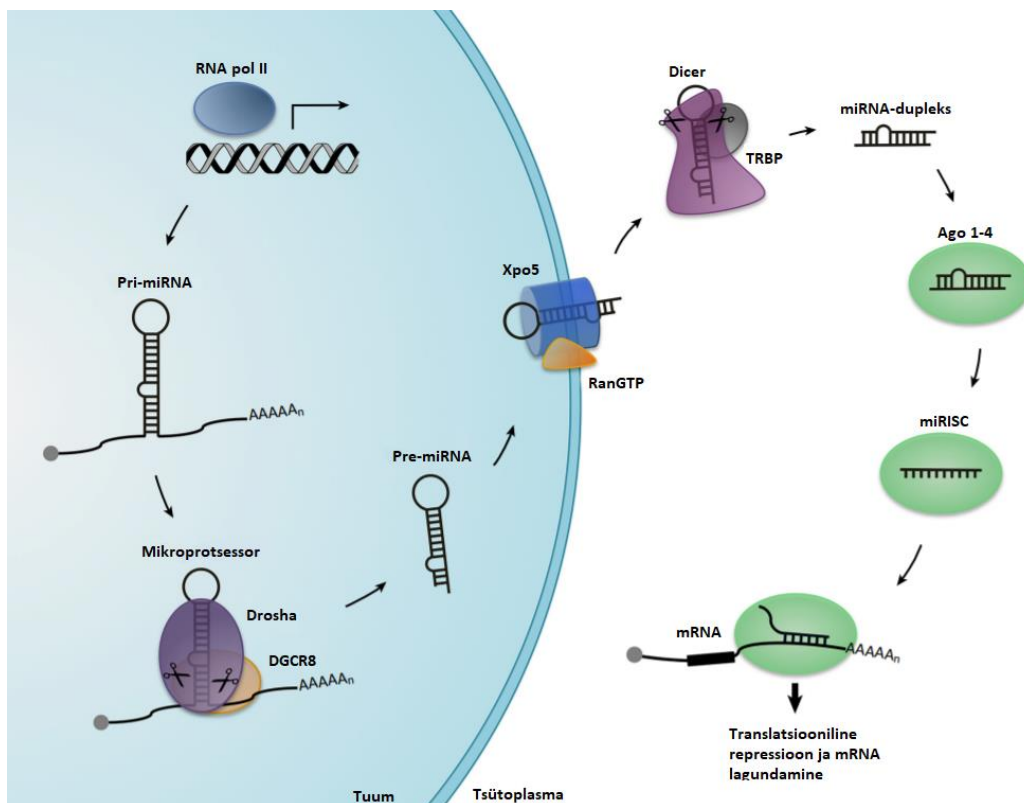
MikroRNA-d ehk miRNA-d on lühikesed, 21-24 nukleotiidi pikkused RNA-d (Lau jt, 2001), mis vähendavad mRNA stabiilsust ja inhibeerivad translatsiooni (He ja Hannon, 2004). miRNA-d moodustavad osa mittekodeerivatest RNA-dest (ncRNA ehk non-coding RNA), mis on funktsionaalsed RNA molekulid, millelt ei transleerita valke. NcRNA-de suur osakaal inimese transkriptoomis avastati pärast ENCODE projekti avaldamist 2012 aastal, milles näidati, et transkriptsioonilist aktiivsust omab 75% inimese genoomist (Palazzo ja Lee, 2005; ENCODE Project Consortium, 2012). MikroRNA-del on mittekodeerivate RNA-de hulgas väga suur tähtsus, kuna üks miRNA võib reguleerida kuni mitutsadat erinevat mRNA märklauda (Baek jt, 2008).

MikroRNA-de biogenees koosneb mitmest etapist, ning algab sellest, kui RNA polümeraas II transkribeerib tuumas pri-miRNA-t (Joonis 3) (Meister jt, 2004).

miRNA esmasele transkriptile, pri-miRNA-le lisatakse polü-A saba 3' otsa ja metüülguanosiinmüts 5' otsa. Kõik pri-miRNA-d moodustavad juuksenõela taolisi struktuure, millel on 33-35 nukleotiidi pikkune tüvi ning üheaheelalised RNA segmendid 3' ja 5' otses (Lee jt, 2003; Lee jt, 2004; Cai jt, 2004). Pri-miRNA-d lõikab järgmise sammuna mikroprotsessor-kompleks, mis koosneb RNAas III tüüpi endonukleaas Droshast ning kahest kofaktori DCGR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*) molekulist. Kofaktori funktsiooniks on Drosha pri-miRNA-le seondumise kontrollimine, seda stabiliseerides ja lõikamise täpsust määrates (Krol, Loedige, Filipowicz, 2010; Denli jt, 2004). Aktiivse mikroprotsessori kompleksi moodustumiseks on minimaalselt vaja 23-st aminohappest koosnevat DGCR8 C-terminuses olevat sabaosa, mis on vastutav ka Drosha valguga seondumise eest (Nguyen jt, 2015).

Mikroprotsessor kompleks lõikab pri-miRNA-d umbes 11 nukleotiidi kauguselt juuksenõela basaalsest osast. Nii tekivad ligikaudu 60 nukleotiidi pikkused prekursor miRNA-d ehk pre-

miRNA-d, millel on 3' otsas kahenukleotiidne üleulatuv ots (Lee jt, 2003). Pre-miRNA-d transporditakse tuumast tsütoplasmasse valgu Exportin 5 (Xpo5) abil (Lund jt, 2004).



Joonis 3. Mikro-RNA biogenees. RNA polümeraas II poolt sünteesitakse juuksenõela talise struktuuriga pri-miRNA, mis edasi töödeldakse tuumas Dorsha-t ning DGCR8-t sisaldava mikroprotsessori poolt, mille tulemusel tekib pre-miRNA. Valk Xpo5 viib pre-miRNA tsütoplasmasse, kus ensüüm Dicer lõikab struktuuri enne ümarat juuksenõela osa, jättes alles miRNA dupleksi. Dupleks laetakse AGO valgule, mille N-domeeni algatusel toimub dupleksi lahtiharutamine. Ühte ahelat kasutatakse miRISC kompleksi moodustamiseks. MiRISC kompleks liigub sihtmärk mRNA-ni ning läbi selle reguleerivad miRNA-d geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt, surudes maha translatsiooni või lagundades mRNA-d. Modifitseeritud Daugaard ja Hansen, 2017 järgi.

Ribonukleas III ensüüm Dicer lõikab pre-miRNA-d 3' otsast, eemaldades juuksenõela struktuuri. Alles jääb 22-nukleotiidi pikkune miRNA dupleks, mille mõlema ahela 3' otsa jääb üle ulatuma kaks nukleotiidi (Bernstein jt, 2001; Winter jt, 2009). Pärast lõikamist vabaneb Dicer ning dupleks seondub AGO valgule *chaperone*-valkude Hsc70/Hsp90 abil (Iwasaki jt, 2010). AGO valk algatab dupleksi lahtiharutamise, tekib primaarne ahel, mis kaasatakse miRISC (miRNA-induced silencing complex) kompleksi ning üleliigne ahel lagundatakse (Gregory jt, 2005).

miRISC kompleksi moodustavad üheaahelaline miRNA, AGO valk ja mitmed abifaktorid (Daugaard ja Hansen, 2017). miRISC-i roll on viia miRNA sihtmärk mRNA-deni. Läbi selle

reguleerivad miRNA-d geeniekspressiooni transkriptsioonijärgselt, surudes maha translatsiooni, deadenüleerides või lagundades mRNA-d (Eichhorn jt, 2014, Hurtzinger ja Izaurralde, 2011). miRNA-d tunnevad ära osaliselt komplementaarseid seondumissaite, mis üldiselt asuvad 3' UTR piirkonnas ning seonduvad nende saitide abil oma sihtmärk mRNA-dega. mRNA komplementaarsus miRNA 5' otsaga, nn seemnejärjestusega, mis hõlmab tavaliselt nukleotiide 2-7, on väga oluline sihtmärgi äratundmisel. Selle osaga seondubki miRNA mRNA-le (Hunzinger ja Izaurralde, 2011).

1.4 MiR-146a funktsioon

MiR-146a on 22 nukleotiidi pikkune ning paikneb inimese genoomi viiendal kromosoomil (Joonis 4). Teadaolevalt on miR-146a peamine funktsioon immuunsüsteemi aktivatsiooni allasurumine, inhibeerides oma märklaudgeenide ekspressiooni (Meisgen jt, 2014).

miR-146a 5'-UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU-3'

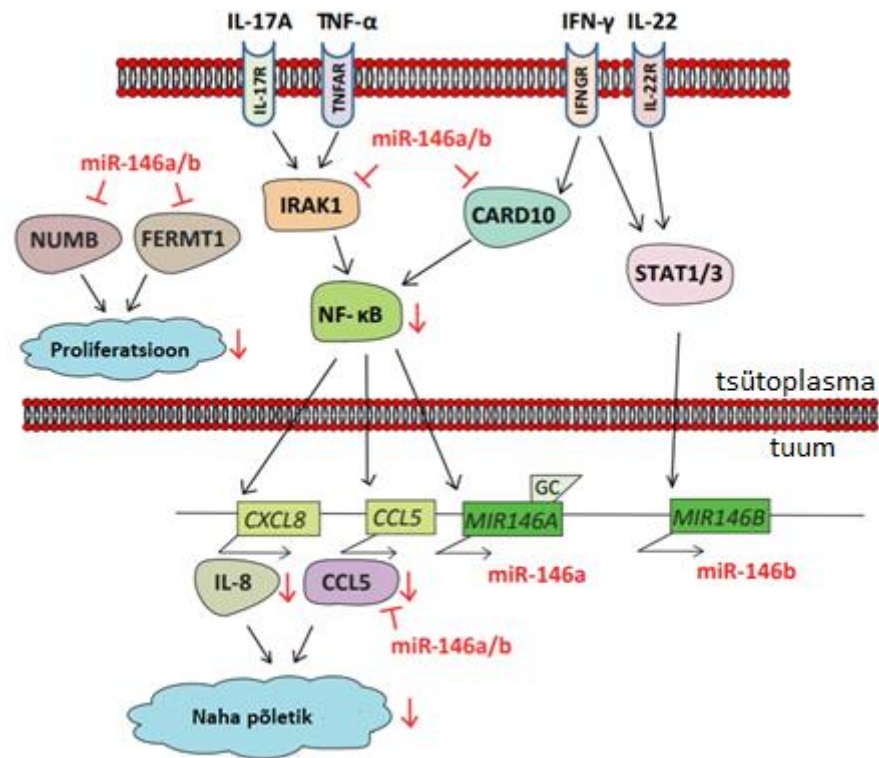
Joonis 4. miR-146a primaarjärjestus¹, saadud miRBase andmebaasist. Seemnejärjestus on märgitud sinise joonega.

miR-146a, mille funktsioon on toodud joonisel 5, enda ekspressioon rakkudes indutseeritakse läbi põletikku soodustava transkriptsioonifaktori NF- κ B sõltuva mehhanismi ning ta on ka NF- κ B (*nuclear factor κ B*) negatiivseks regulaatoriks (Taganov jt, 2006, Tang jt, 2009). miR-146a inhibeerib mitmeid NF- κ B raja liikmeid, näiteks TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*), IRAK1 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) ja CARD10 (*caspase recruitment domain-containing protein 10*) (Taganov jt, 2006, Tang jt, 2009, Crone jt, 2012). Negatiivse tagasiside tulemusena põhjustab miR-146a rakkudes immuunvastuse supressiooni (Meisgen jt, 2014). Kui jälgiti hiiri, kellel puudub miR-146a, siis avastati, et neil kujuneb 6-8 kuu vanuselt spontaanselt välja autoimmuunsus. Seda põhjustab NF- κ B aktiveerumine T-rakkudes ning STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) üleaktiveerumine regulatoorsetes T-rakkudes (Lu jt, 2010, Boldin jt, 2011).

¹ miRBase andmebaas, külastatud 29.04.2018, http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000449

Lisaks surub miR-146a alla mitmete põletikuliste tsütokiinide tootmist, näiteks CCL5 (*C-C motif chemokine*), mille ülesanne on nahas põletiku piirkonda kohale kutsuda eosinofiile ja makrofaage. Samuti põhjustab miR-146a IL-8, mis kutsub kohale T-rakke ning neutrofiile, taseme vähenemist ning miR-146a surub alla IL-6 ja CCL11 taset (Rebane jt, 2014, Zhu jt, 2013, Urgard jt, 2016). On näidatud, et miR-146a toimib põletiku vastase mikroRNA-na atoopilise dermatiidi (Rebane jt, 2014), ärritava kontaktdermatiidi (Urgard jt, 2016) ja psoriaasi (Srivastava jt, 2017) hiire mudelites.

MiR-146a oluline funktsioon on ka proliferatsiooni pärssimine. On tõestatud, et hiirtel, kelle nahas puudub miR-146a, esineb keratinotsüütide hüperproliferatsioon (Larjava jt, 2008). Nahas on selle mikroRNA märklaudadeks keratinotsüütide proliferatsiooni soodustajad EGFR (*epidermal growth factor receptor*) ning FERMT1 (*fermitin family homolog 1*) valk (Zhang jt, 2014; Hermann, 2017 Larjava jt, 2008). FERMT1 kodeerib valku Kindlin-1, mis on tugevalt ekspresseerunud naha epidermises. Keratinotsüütides, milles puudub Kindlin-1 valk, on täheldatud vähenenud proliferatsiooni. Kuna Kindlin-1 on seotud integrini aktivatsiooni reguleerimisega, arvati, et antud valgu puudumisel tekkiv vähenenud proliferatsioon võib olla seotud ebatavalise integrinide regulatsiooniga (Larjava jt, 2008).



Joonis 5. miR-146a funktsioon keratinotsüütides. MiR-146a inhibeerib NF-κB signaalirada, inhibeerides otseselt IRAK-1, CARD10 ja CCL5 ning kaudselt IL-8, surudes nii alla põletikulisi reaktsioone nahas. Proliferatsiooni surub miR-146a alla, inhibeerides NUMB ja FERMT1 ekspressiooni. Modifitseeritud Hermann jt, 2017 järgi.

1.5 MikroRNA miimid

MikroRNA miimid on keemiliselt sünteesitud RNA molekulid, mis imiteerivad endogeenseid mikroRNA-sid. Miimid omavad endogeense miRNA-ga sama järjestust ning reguleerivad samade sihtmärkeenide ekspressiooni (Li jt, 2014). MikroRNA miimidele lisatakse tihti keemilisi modifikatsioone või nukleotiidide muutusi, mis puuduvad endogeensetel miRNA-del, et parandada miimide rakku sisenemist takistavaid omadusi. Miimide transfektsioonil piisab madalatest kontsentratsioonidest, et saavutada füsioloogilisest tasemest kõrgem miRNA tase. Kommertsiaalsete mikroRNA miimide suurim puudus on see, et miimi täpset järjestust ning sellesse viidud mutatsioone ei avaldata kasutajale ja see võib viia kasutaja poolt läbi viidavate katsete ebaõnnestumiseni (Jin jt, 2015). See on ka põhjuseks, miks antud bakalaureusetöös kasutati teadaolevate järjestuste ning modifikatsioonidega miime.

Üheahelaliste miimide kasutamine sai alguse siRNA-dest (*small interfering RNA*), mille puhul avastati, et need suudavad esile kutsuda RNA interferentsi. Saavutatud interferentsi tugevus jääb aga kõvasti alla endogeense siRNA interferentsile (Martinez jt, 2002; Schwarz jt, 2002). MikroRNA miimidega tehtud katsetes on samuti näidatud, et üheahelalised miimid ei kutsu esile kaheahelaliste miimidega võrdväärset geeniekspressiooni muutust (Chorn jt, 2012). MikroRNA-de biogeneesi käigus lõikab ensüüm Dicer pre-miRNA-d ning moodustub kaheahelaline kompleks, mis seondub Argonaut perekonna valguga Ago2-ga. Sealt algab kompleksi lõhkumine, mille käigus üks ahel lagundatakse ja allesjäänud juhtahel seondub sihtmärk mRNA 3' UTR-ga oma seemnejärjestuse abil (Bartel, 2009; Kim jt, 2009). Üheahelaliste miimide madalama funktsionaalsuse põhjuseks arvatakse olevat Argonaut valkude perekonda kuuluva Ago2 valguga siduda võimet siduda kaheahelalist RNA-d (Chendrimada jt, 2005; Chorn jt, 2012).

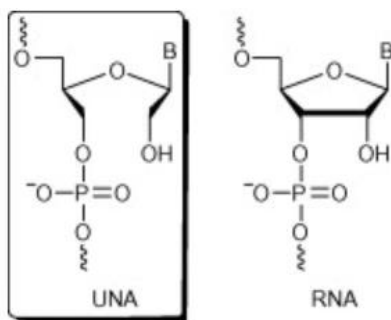
Selle puuduse tõttu on suurem osa uurimistöödest koondunud ümber kaheahelaliste miRNA miimide (Li jt, 2014). Kaheahelalisi miime kasutatakse enamasti vähkkasvajate uurimisel. Miimide abil taastatakse vähkkasvaja poolt maha surutud miRNA-de tasemed, mis käituvad õigel ekspressioonitasemel vähi repressoritena (Lu jt, 2005; Reid jt, 2016). Esimene miRNA miimil põhinev ravim, mis lubati kliinilistele katsetele, oli MRX34. MRX34 käitub maksas endogeense miR-34-na, mis surub alla maksavähi teket (Boucic, 2013). Kliinilised katsed antud ravimiga lõpetati toksilisuse tõttu (Rupaimoole jt, 2017).

1.6 UNA

UNA (*unlocked nucleic acid*) on atsükliline RNA analoog, milles puudub side riboosi C2' ja C3' aatomite vahel (Langkjær jt, 2009). UNA ja RNA struktuurid on toodud joonisel 6. Selline lihtne muudatus, ilma uusi funktsionaalseid rühmi lisamata, teeb UNA sarnaseks naturaalsele RNA monomeeridele. Erinevusena RNA-dest on UNA-del suurem paindlikkus (Wengel ja Pasternak, 2010).

Esimesena sisestati tümidiini UNA monomeer DNA oligonukleotiididesse aastal 1995. Leiti, et DNA duplexi destabilisatsioon sõltub nii sellest, kuhu UNA ahelates paigutatud on, kui ka ahelate pikkusest. Kõige väiksemat sulamistemperatuuri muutust põhjustab UNA monomeeri asetamine duplexi otsadesse. UNA efekt on kumulatiivne, mida rohkem on ahelas UNA monomeere, seda väiksem on selle stabiilsus (Nielsen jt, 1995).

Katses siRNA-dega avastati, et UNA monomeeri lisamine vähendab siRNA-de sihtmärgivälist efekti. UNA monomeeriga modifitseeritud siRNA antisense ahel liideti 13 nukleotiidi pikkusele RNA-le, mis oli komplementaarne siRNA nukleotiididega 1 kuni 9. Kõige mõjuvam oli efekti vähenemine, kui UNA sisestati siRNA seitsmendale positsioonile (Bramsen jt, 2010).



Joonis 6. UNA ja RNA struktuurid kõrvutatult. UNA-l puudub side riboosi C2' ja C3' aatomite vahel võrreldes RNA-ga. Modifitseeritud Langkjær jt, 2009 järgi.

Antud töös kasutati UNA modifikatsiooniga mikroRNA miime, võrreldes neid modifitseerimata miimidega, et leida, kas UNA monomeerida lisamine aitab vähendada sihtmärgivälist efekti ja läbi selle muudab mikroRNA-d spetsiifilisetemaks.

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1 Töö eesmärgid

On teada, et rakku sisenev peptiid PepFect14 suudab edukalt keratinotsüütidesse viia kaheaahelisi kommertsiaalseid mikroRNA miime. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kindlaks teha, kas koostööpartnerite poolt sünteesitud modifitseeritud üheaahelised ja kaheaahelised miRNA miimid on funktsionaalsed ja seega kasutatavad edasipidises teadustöös ja arendustegevuses. Antud töö täpsemateks eesmärkideks olid:

- teha kindlaks, kas üheaahelisi miime on võimalik keratinotsüütidesse transportida;
- analüüsida, kas rakkudesse viidud miR-146a miimid on seal funktsionaalsed;
- uurida, kas üheaaheliste komplementaarsete miimide liitmisel saadud kaheaahelised miimid sisenevad rakkudesse ning käituvad seal sarnaselt kommertsiaalsete miRNA miimidega;
- selgitada välja, kas peale PepFect14 on veel rakku sisenevaid peptiide, mille abil on võimalik mikroRNA miime keratinotsüütidesse viia.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Rakkude kasvatamine ja paljundamine

Käesolevas töös kasutati primaarseid normaalseid inimese epidermaalseid keratinotsüüte (NHEK- *Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes*), rakkude kasvatamiseks kasutati Keratinocyte-SFM söödet (Invitrogen, USA), millele oli lisatud streptomütsiini ja penitsilliini (1:1000) (Lonza, Šveits). Rakud kasvasid ja paljunesid koekultuuri tassidel, mis asusid 37° C temperatuuri, 5% CO₂ sisaldusega ning veeauruga küllastunud inkubaatoris. Rakkude pesemiseks kasutati PBS-i, neid külvati ümber Trüpsiini-EDTA lahusega (GE Healthcare, UK) ning trüpsiini toime peatati trüpsiini neutraliseeriva lahusega (Invitrogen, USA).

2.2.2 Transfektsioon erinevate peptiididega

Keratinotsüüdid jagati enne transfekteerimist 12 kannuga plaatidele, 40 000 rakku kannu kohta. Rakke transfekteeriti peptiididega PF14, NF55, NF70, C-12-14 ning C-22-14. Mikro-RNA ja peptiidi suhte 1:17 (PF14, NF70, C-12-14 ja C-22-14) puhul segati iga kannu kohta kokku

transfektsioonisegu, kus oli 5,12 µl 100 µM kontsentratsiooniga peptiidi, 93,38 µl milliQ vett ning 1,5 µl mikroRNA hsa-miR-146a-5p miim (miRIDAN, Dharmacon, USA) või negatiivne kontroll (miRIDAN, Dharmacon, USA). Suhte 1:28 (NF55) puhul segati iga kannu kohta kokku transfektsioonisegu, kus oli 8,5 µl 100 µM kontsentratsiooniga peptiidi, 89,97 µl milliQ vett ning 1,5 µl mikroRNA hsa-miR-146a-5p miim (miRIDAN, Dharmacon, USA) või negatiivne kontroll (miRIDAN, Dharmacon, USA). Lõppkontsentratsiooniks oli miRNA-del 30 nM. Mõlemal juhul jäeti segu tunniks ajaks inkubeerima ning lisati siis 900 µl uude Keratinocyte-SFM söötmesse (Invitrogen, USA). Vana sööde eemaldati ning transfektsioonisegu sisaldav uus sööde lisate plaatidele.

Tabel 1. Kasutatud peptiidide järjestused

PF14	Stearüül-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL
NF55	(Stearüül-AGYLLG)δ-OINLKALAALAKAIL-NH ₂
NF70	Publitseerimata järjestus
C-12-14	CH ₃ -(CH ₂) ₁₀ -CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-CONH ₂
C-22-14	CH ₃ -(CH ₂) ₂₀ -CONH-AGYLLGKLLOOLAAAALOOLL-CONH ₂

2.2.3 Transfektsioon erinevate mikroRNA miimidega

Eraldiseisvas katses uuriti Jesper Wengeli (Füüsika, keemia ja farmaatsia osakond, Biomolekulaarse Nanoinseneeringu keskus, Lõuna-Taani Ülikool) sünteesitud ühe- ja kaheaahelaliste miimide efektiivsust, rakke transfekteriti esmalt üheaahelaliste miimidega, ning siis nende kokku segamisel saadud kaheaahelaliste miimidega. Kõikides katsetes Jesper Wengeli poolt sünteesitud mikroRNA miimidega oli kasutusel rakku sisenev peptiid PepFect14. Transfektsioonidel nii ühe- kui ka kaheaahelaliste miimidega kasutati positiivse kontrollina kommertsiaalseid miime, milleks olid mikroRNA hsa-miR-146a-5p miim (miRIDAN, Dharmacon, USA) ja negatiivne kontroll (miRIDAN, Dharmacon, USA). Miimide järjestused on toodud tabelites 2 ja 3, paksus kirjas on esile tõstetud erinevused miR-146a ahelast. Kaheaahelaliste miRNA-de transfektsiooniks segati kokku järgnev segu: 1,5 µl miRNA-t, 93,38 µl milliQ vett ning 5,12 µl 100µM kontsentratsiooniga peptiid PF14.

Üheaahelaliste miimide transfektsioonisegus suhtega 1:17 oli 1,5 µl miRNA miimi, 95,5 µl mQ vett ja 4 µl 100µM kontsentratsiooniga peptiidi PF14. Lisaks antud suhtele katsetati kahe üheaahelalise miimi rakku sisenemist ning seal funktsioneerimist ka suhetega 1:10 ja 1:5. Nende suhete puhul segati kokku järgnevad transfektsioonisegud: 1,5 µl miRNA miimi, 95,5 µl mQ vett ja 3 µl 100µM kontsentratsiooniga peptiidi ning 1,5 µl miRNA miimi, 97 µl mQ vett ja 1,5 µl 100µM kontsentratsiooniga peptiidi PF14. MikroRNA-de lõppkontsentratsioon oli 30 nM. Segud inkubeerisid tund aega, edasi pipeteeriti need eraldi 900 µl-sse Keratinocyte-SFM söötmesse (Invitrogen, USA) ning sellega asendati kannus olev vana sööde.

Tabel 2. Kasutatud üheaahelaliste miimide järjestus

miR-146a	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA rA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA rU-3'
Kontroll	5'-rU rG rU rG rA rC rC rU rG rA rA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA rU-3'
miR-146a UNA II	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA uA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA uU -3'
miR-146a UNA I	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA uA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA uU -3'
3'-ahel	5'-rC rC rC rA rU rG rG rA rA rU rU rC rA rG rU rU rC rU rC rA rU uU -3'

Tabel 3. Kasutatud kaheaahelaliste miimide järjestus

Kontroll + 3'-ahel	5'-rU rG rU rG rA rC rC rU rG rA rA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA rU-3' 3'- uU rU rA rC rU rC rU rU rG rA rC rU rU rA rA rG rG rU rA rC rC rC-5'
miR-146a + 3'-ahel	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA rA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA rU-3' 3'- uU rU rA rC rU rC rU rU rG rA rC rU rU rA rA rG rG rU rA rC rC rC-5'
miR-146a UNA II + 3'-ahel	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA uA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA uU -3' 3'- uU rU rA rC rU rC rU rU rG rA rC rU rU rA rA rG rG rU rA rC rC rC-5'
miR-146a UNA I + 3'-ahel	5'-rU rG rA rG rA rA rC rU rG rA uA rU rU rC rC rA rU rG rG rG rA uU -3' 3'- uU rU rA rC rU rC rU rU rG rA rC rU rU rA rA rG rG rU rA rC rC rC-5'

2.2.4 RNA eraldamine inimese primaarsetest keratinotsüütidest

Eraldamaks rakkudest RNA-d, kasutati Total RNA Zol-Out™ komplekti (A&A Biotechnology, Poola). Rakkudelt eemaldati sööde, ning neile lisati 500 µl QIAzol reagenti (Qiagen, Saksamaa). Rakulüsaat koguti 1,5 ml tuubidesse ning igasse tuubi lisati 110 µl kloroformi (AppliChem, Saksamaa). Lüsaadi ja kloroformi segu segati, raputades tuube 20 sekundit. Seejärel segu inkubeeriti 3 minutit ning tsentrifuugiti 12 000 rcf ja 4°C juures 15 minutit (Eppendorf 5424 R, FA-45-24-11 rootor, Saksamaa). Järgmise sammuna eraldati vesifaas, millele lisati 1:1 suhtega isopropanooli. Vesifaasi ja isopropanooli segu kanti minikolonnidele ja edasi eraldati RNA-d vastavalt tootja poolt väljastatud protokollile. RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks kasutati NanoDrop 2000c spektrofotomeetrit (Thermo Scientific, USA).

2.2.5 RT-qPCR mRNA tasemete uurimiseks

Selleks, et teostada RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) meetodil mRNA tasemete analüüsi, sünteesis esmalt RNA-le komplementaarne DNA (cDNA). Selleks kanti jääl 96 kannuga plaadile 11,5 µl RNA proovi, 1 µl oligo(dT)₁₈ praimerit (100µM) (TAG Copenhagen, Taani) ja 2 µl nukleotiidide segu (Thermo Scientific, USA). Plaati kuumutati RNA sekundaarstruktuuride eemaldamiseks 5 minutit 65°C juures, pärast mida viidi plaat uuesti jää peale ning lisati 4 µl RT puhvrit, 1 µl RevertAid pöördtranskriptaasi ja 0,5 µl RNAasi inhibiitorit (Thermo Scientific, USA). cDNA süntees viidi läbi termotsükleri Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) abil, kus hoiti plaati tund aega 42°C ja 10 minutit 75°C juures. Saadud cDNA lahjendati 500 µl-ni.

384 kannuga plaadile kanti igasse kannu 1 µl segu 4 µM *forward+reverse* praimeritest (TAG Copenhagen, Taani), 2,4 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR segu (Solis Biodyne, Eesti) ning 2,6 µl mQ vett. Järgmisena pipeteeriti igasse kannu 6 µl eelnevalt sünteesitud ning lahjendatud cDNA proovi ja plaat asetati masinasse ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Iga proovi mõõdeti kolm korda ning saadud Ct (*threshold cycle*) väärtusi analüüsiti MS Exceli abil (Microsoft, USA). Kasutatud geenide ekpressioon normaliseeriti referentsgeeni EF1A suhtes (*Elongation factor 1-alpha*). Kõik kasutatud praimerid ja qPCR-i programm on kujutatud vastavalt tabelites 4 ja 5.

Tabel 4. Kasutatud praimerid

Praimer		Järjestus
EF1A	F	5' CCACCTTTGGGTCGCTTTGCTGT 3'
	R	5' TGCCAGCTCCAGCAGCCTTCTT 3'
CARD10	F	5' AGTGTGCCCAGCGGAAAGCC 3'
	R	5' GATGGCCCGGATCCTGCTGC 3'
IL-8	F	5' GCAGCTCTGTGTGAAGGTGCAGTT 3'
	R	5' TTCTGTGTTGGCGCAGTGTGGTC 3'
IRAK1	F	5' GACCAAGTATCTGGTGTACGA 3'
	R	5' GACACGTAGGAGTTCTCCTG 3'

Tabel 5. mRNA qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Ensüümi aktivatsioon	95	15 minutit	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	1 minut	
Dissotsiatsioonianalüüsi etapp	95	15 sekundit	1
	60	1 minut	
	95	15 sekundit	

2.2.6 RT-qPCR miRNA tasemete uurimiseks

Esmalt sünteesiti igale miRNA-le individuaalne cDNA. Selleks kasutati TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, US) praimereid miRNA-dele miR-146a ja let-7a. Kasutatud praimerid seonduvad spetsiifiliselt oma 3'-poolses alas oleva 8 nukleotiidiga igale miRNA-le spetsiifiliselt. 96 kannuga plaadile lisati igasse kannu 0,028 µl 100 mM kontsentratsiooniga

dNTP segu, 0,2 µl 100 µM kontsentratsiooniga RT ensüümi, 0,6 µl 10x RT puhvrit, 0,1 µl RNAasi inhibiitorit ning 2,07 µl milliQ vett. Plaat asetati masinasse Mastercycler® nexus (Eppendorf, Saksamaa) ja kasutati järgnevat programmi: 30 minutit 16°C, 30 minutit 42 °C, 10 minutit 85 °C. Valmis cDNA-d säilitati -20 °C juures.

cDNA analüüsiti masinaga ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). 96 kannuga plaadil olevatele cDNA proovidele lisati 4,4 µl 5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Eesti), 1 µl 20x TaqMan® MicroRNA Assay (Life Technologies, USA) praimereid (miR-146a või let-7a) ja 11,6 µl milliQ vett. Antud segu jagati laiali 384 kannuga plaadile ning analüüsiti ViiA 7 abil. Kasutatud programm on välja toodud tabelis 6. Iga proovi mõõdeti kaks korda ning saadud Ct (*threshold cycle*) väärtusi analüüsiti MS Exceli abil (Microsoft, USA). Kasutatud geenide ekspressioon normaliseeriti referentsgeeni let-7a suhtes.

Tabel 6. miRNA qPCR programm

Etapp	Temperatuur (°C)	Aeg	Korduste arv
Ensüümi aktivatsioon	95	10 minutit	1
Denaturatsioon	95	15 sekundit	40
Produkti paljundamine	60	60 sekundit	

2.2.7 Statistiline analüüs

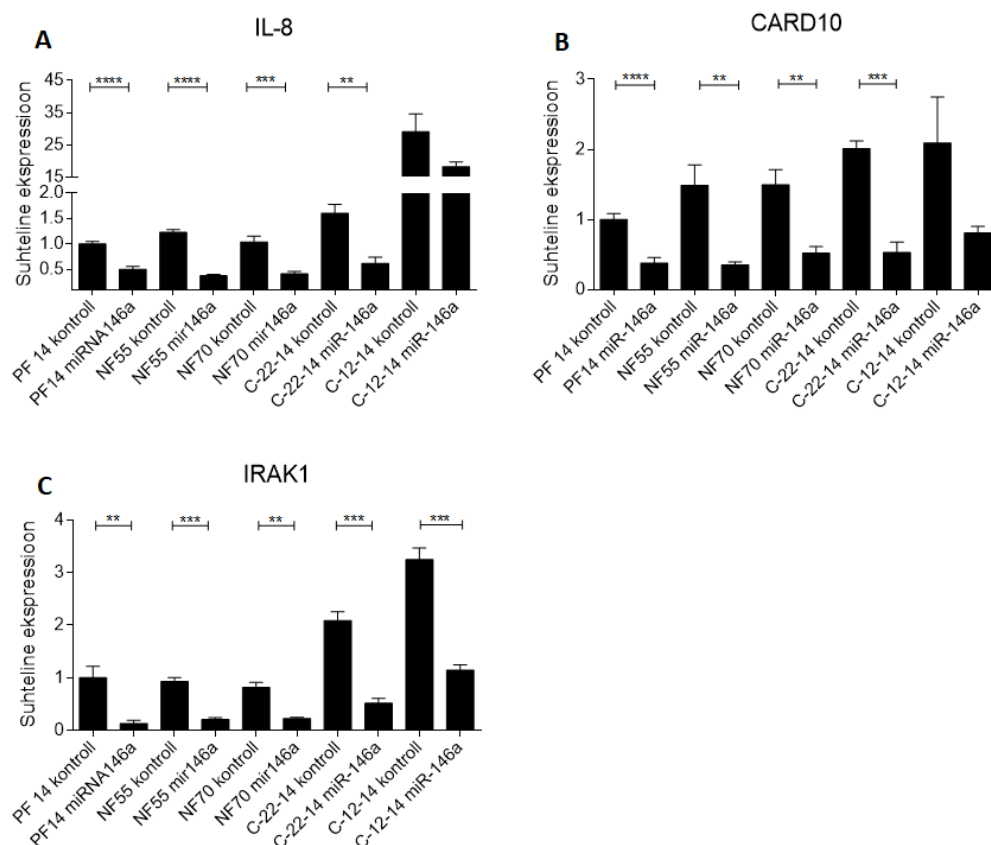
Andmete analüüsiks ning tulemuste esitamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, USA). Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi (*Unpaired T-test*), mille abil saab võrrelda sõltumatute valimite keskmisi väärtusi. Graafikutel on näidatud katsete tulemused koos standardveaga (*standard error of the mean*, SEM).

2.3 TULEMUSED

2.3.1 Erinevad rakku sisenevad peptiidid on võimelised mikroRNA miime keratinotsüütidesse efektiivselt transportima

Antud töö eesmärk oli uurida Jkoostööpartnerite poolt sünteesitud miimide funktsionaalsust inimese primaarsetes keratinotsüütides. Kogu töö vältel valiti geeniekspressiooni muutuse jälgimiseks teadaolevad miR-146a sihtmärkgeenid IL-8, CARD10 ning IRAK1, millest IRAK1 ja CARD10 on miR-146a otsesed sihtmärgid ja IL-8 on kaudselt mõjutatud geen (Rebane jt, 2014). Esmalt sooviti uurida erinevate rakku sisenevate peptiidide efektiivsust kommertsiaalsete mikroRNA miimide keratinotsüütidesse viimisel, et valida välja efektiivseim peptiid järgnevate katsete teostamiseks. Antud bakalaureusetöös kasutati PepFect14 ja selle täiustatud analooge C-22-14 ja C-12-14 ning NickFect55 ja 70.

Peptiidide efektiivsuse hindamiseks transfekteriti inimese primaarseid keratinotsüüte miR-146a miimiga või vastava kontrolliga kasutades eelpool mainitud peptiide. Saadud tulemuste põhjal on näha, et erinevate peptiidide puhul ei ole märkimisväärset erinevust transfektsiooni efektiivsuses (Joonis 7). Transfektsioon enamiku peptiididega andis statistiliselt olulisi tulemusi kõigi valitud miR-146a sihtmärkgeenidega. IL-8 ekspressioon langes miR-146a-ga transfekterides 2 ($\pm 0,07$) korda PF14 puhul; 3,28 ($\pm 0,05$) korda NF55; 2,53 ($\pm 0,12$) korda NF70 ning 2,62 ($\pm 0,21$) korda C-22-14 puhul võrreldes vastavate kontrollidega (Joonis 7A). Samad peptiidid vahendasid miR-146a poolt tingitud geeniekspressiooni langust CARD10 puhul vastavalt 2,64 ($\pm 0,12$); 4,18 ($\pm 0,29$); 2,87 ($\pm 0,25$) ning 3,81 ($\pm 0,18$) korda (Joonis 7B) ning IRAK1 puhul 7,81 ($\pm 0,21$); 4,55 ($\pm 0,08$); 3,59 ($\pm 0,12$) ning 4,06 ($\pm 0,21$) korda (Joonis 7C). Kõige ebaefektiivsema peptiidina võib välja tuua C-12-14, kuna antud peptiidi puhul leiti statistiliselt oluline geeniekspressiooni langus vaid IRAK1 miR-146a-ga transfekterides (2,83 ($\pm 0,25$) kordne), IL8 ja CARD10 puhul puudus statistiliselt oluline muutus. Samuti põhjustas see peptiid keratinotsüütides IL-8 taseme 29,05 ($\pm 2,98$) kordse tõusu võrreldes PF14 kontroll transfektsiooniga. Kuna erinevate peptiidide vahel märkimisväärseid erinevusi ei nähtud, siis otsustati miimide efektiivsuse hindamiseks kasutada peptiidi PF14, kuna antud peptiidiga on laboris eelnev töökogemus.

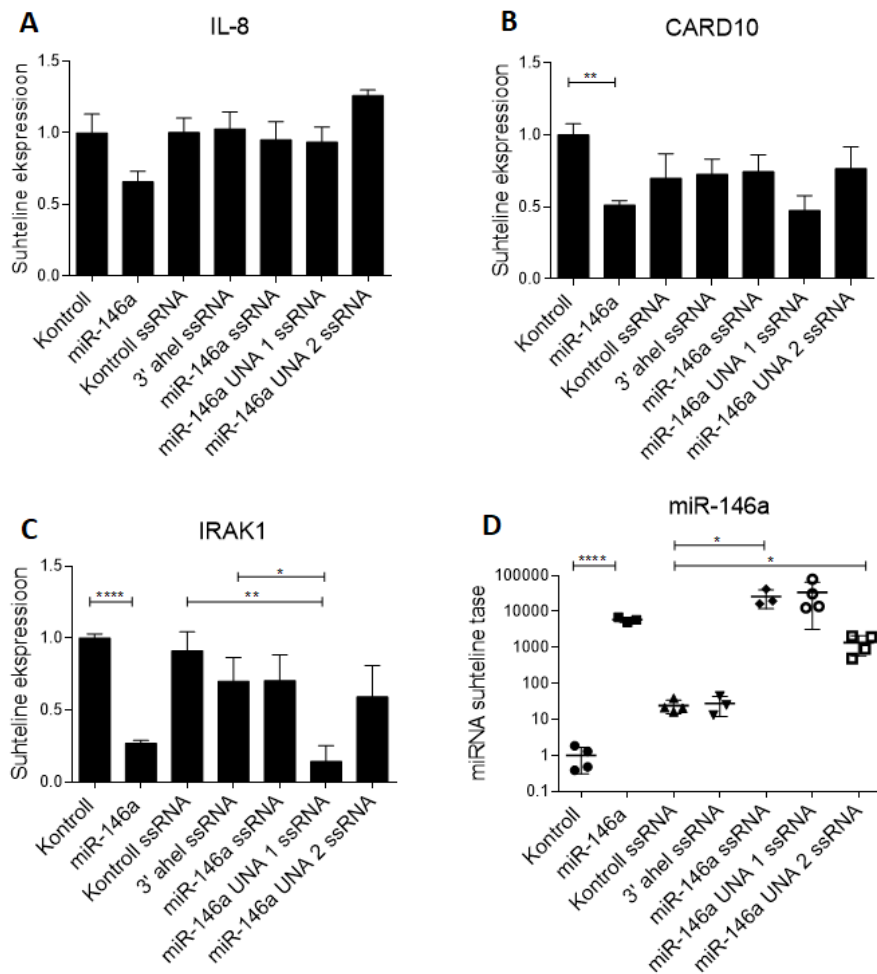


Joonis 7. Keratinotsüütide transfektsioon erinevate rakku sisenevate peptiididega. Inimese primaarseid keratinotsüüte transfekteeeriti 24 h joonisel näidatud peptiididega. Rakku sisenevatest peptiididest kasutati PepFect14, selle analooge C-12-22 ja C-22-14 ning NickFect55 ja NickFect70. Rakkudesse viidi kaheaahelaline miR-146a, mille ekspressiooni võrreldi iga peptiidi puhul vastava negatiivse kontrolliga. Sihtmärkgeenidena kasutati IL-8 (A), CARD10 (B) ning IRAK1 (C). mRNA tase leiti qPCR-i meetodil. Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi ja veapiiridena on esitatud SEM. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

2.3.2 Üheaahelised miR-146a miimid on madala efektiivsusega

Varasemalt on näidatud, et mikroRNA üheaahelised miimid on vähem efektiivsed kui kaheaahelised miimid, kuid see võib sõltuda modifikatsioonidest, mis miimidele lisatud on (Chorn jt, 2012). Käesolev uurimistöö teostati uurimaks, kas inimese primaarsetes keratinotsüütides on üheaahelised miimid ja UNA modifikatsioonidega miimid sama efektiivsed kui kommertsiaalsed kaheaahelised miimid. Lisaks üheaahelalistele ssRNA kontroll-, 3'- ja miR-146a ahelatele ning kahele UNA modifikatsioonidega ahelale toodi tulemustes võrdluseks välja kommertsiaalsed kaheaahelised miimid: kontroll ja miR-146a. Joonis 8 näitab, et kommertsiaalse kontrolli ja miR-146a ekspressioonitasemete vahel saadi statistiliselt oluline langus CARD10 (joonis 8B) ja IRAK1 (joonis 8C) puhul (vastavalt $1,95 (\pm 0,07)$ ning $3,71 (\pm 0,03)$ kordne muutus), aga võrreldes üheaahelalist kontrolli teiste üheaahelaliste

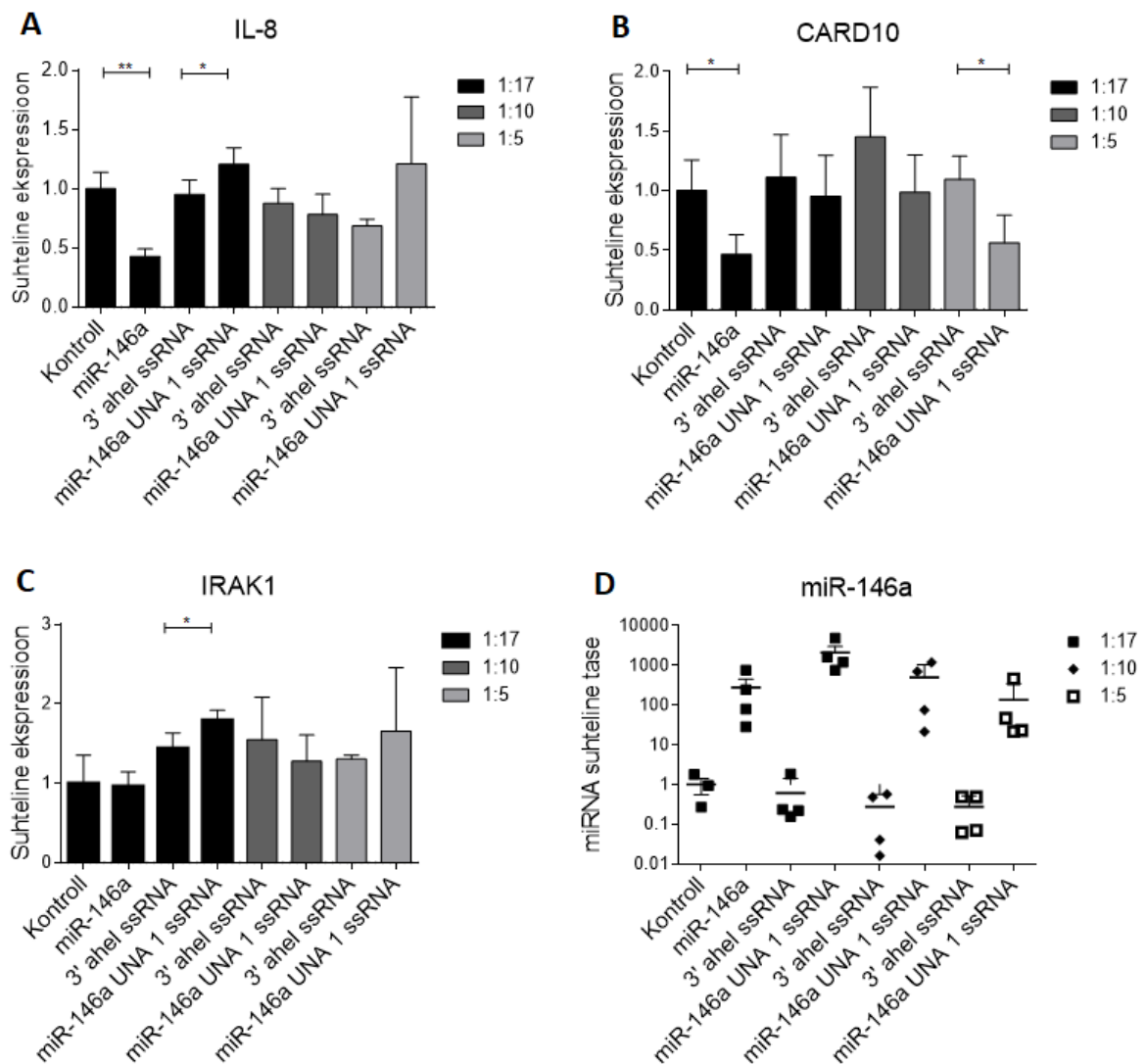
miimidega ei saadud ühegi geeni korral statistiliselt olulist muutust geeni ekspressiooni tasemes. Vaid üheaahelalise kontrolli, 3'-ahela ja ühe UNA modifikatsiooniga ahela puhul oli IRAK1 ekspressiooni vähenemine statistiliselt oluline. Võrreldes ühe UNA monomeeriga ahelat üheaahelalise kontrolliga esines 6,29 ($\pm 0,17$) kordne langus mRNA tasemes ning võrreldes sama ahelat 3'-ahelaga ilmnes 4,82 ($\pm 0,2$) kordne vähenemine. Joonisel 8A on välja toodud, et sihmärkgeeni IL-8 puhul ei esine statistiliselt olulisi muutusi. Joonis 8D kinnitab, et kõik miRNA-146a üheaahelalised miimid sisenesid rakkudesse efektiivselt. Kommertsiaalsete kaheaahelaliste miimide puhul miR-146a tase suurenes 5923 ($\pm 466,7$) korda võrreldes kommertsiaalse kontrolliga. Üheaahelalise kontrolli tase erines statistiliselt oluliselt üheaahelalise miR-146a ning kahe UNA monomeeriga ahela miRNA tasemetest- miR-146a ekspressioon suurenes vastavalt 1075,52 (± 6760) ning 55,88 ($\pm 384,6$) korda võrreldes üheaahelalise kontrolliga. Tulemustest saab järeldada, et kuigi kasutatud miimid suutsid rakkudesse siseneda, olid need seal madala funktsionaalsusega.



Joonis 8. miR-146a sihtmärkgeenide ekspressioon üheaahelaliste ja kommertsiaalsete miR-146a miimidega transfekteerides. Inimese primaarseid keratinotsüüte transfekteeriti joonisel välja toodud miimidega. Transfektsioon kestis 24 tundi. Üheaahelalisteks miimideks on kontrollahel (Kontroll ssRNA), 3'-ahel (3'-ahel ssRNA), üheaahelaline miR-146a (miR-146a ssRNA), ühe UNA modifikatsiooniga ahel (miR-146a UNA 1 ssRNA) ning kahe UNA modifikatsiooniga ahel (miR-146a UNA 2 ssRNA). Võrdluseks toodi välja ka kaheaahelalised kommertsiaalsed negatiivne kontroll ning miR-146a. Joonistel 8A, 8B, 8C leiti mRNA tase rakkudes RT-qPCR-i abil. Tulemused on normaliseeritud koduhoidja geeni EF1A suhtes. Joonis 8D- üheaahelaliste miimide miRNA tase rakkudes leiti RT-qPCR-i abil ning tulemused normaliseeriti koduhoidja let-7 vastu. Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi, veapiiridena esitatud SEM. N=3-4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$.

2.3.3 MikroRNA ja peptiidi molaarse suhte erinevused ei mõjuta oluliselt üheaahelaliste miimide funktsionaalsust

Eelnevalt leiti, et rakkudesse viidud üheaahelalistest miimidest võiks edukaim olla ühe UNA monomeeriga miR-146a miim. Seetõttu võetigi antud ahel koos kontrollina kasutatava 3'-ahelaga vaatluse alla kolme erineva mikroRNA-peptiidi suhte juures, kuna miRNA-peptiid suhe 1:17 on optimeeritud kaheaahelaliste miimide kasutamiseks. Lisaks esimeses katses kasutatud suhtele 1:17, uuriti mikroRNA-de funktsionaalsust ka suhete 1:10 ning 1:5 juures. Suhtega 1:17 võeti võrdluseks ka kaheaahelalise negatiivse kontrolli ning miR-146a mRNA tase. Statistiliselt olulised erinevused ilmneseid IL-8 ning CARD10 puhul kasutades kommertsiaalseid miime - vastavalt 2,33 (\pm 0,09) ning 2,15 (\pm 0,15) kordne vähenemine geeniekspressioonis, võrreldes kontrolli miR-146a transfektsiooniga. Suhte 1:17 juures leiti statistiliselt oluline erinevus ekspressiooni muutuses ka üheaahelalise 3'-ahela ning ühe UNA monomeeriga ahela võrdlusel sihtmärkgeenide IL-8 ning IRAK1 transfektsioonil - vastavalt 0,79 (\pm 0,09) ja 0,82 (\pm 0,17) kordne ekspressiooni suurenemine. Suhe 1:10 ei andnud statistiliselt olulisi erinevusi ning suhe 1:5 andis 1,94 (\pm 0,16) kordse ekspressioonitaseme languse 3'-ahela ja ühe UNA modifikatsiooniga ahela vahel, vaadeldes geeni CARD10. Joonisel 9 (A, B, C) on näha, et UNA monomeeriga ahel ei toiminud siiski hästi ühegi kontsentratsiooni juures ning joonisel 9D on näidatud, et mikroRNA üheaahelalised miimid olid küll rakus olemas, kuid esines suur varieeruvus mikroRNA tasemetes.

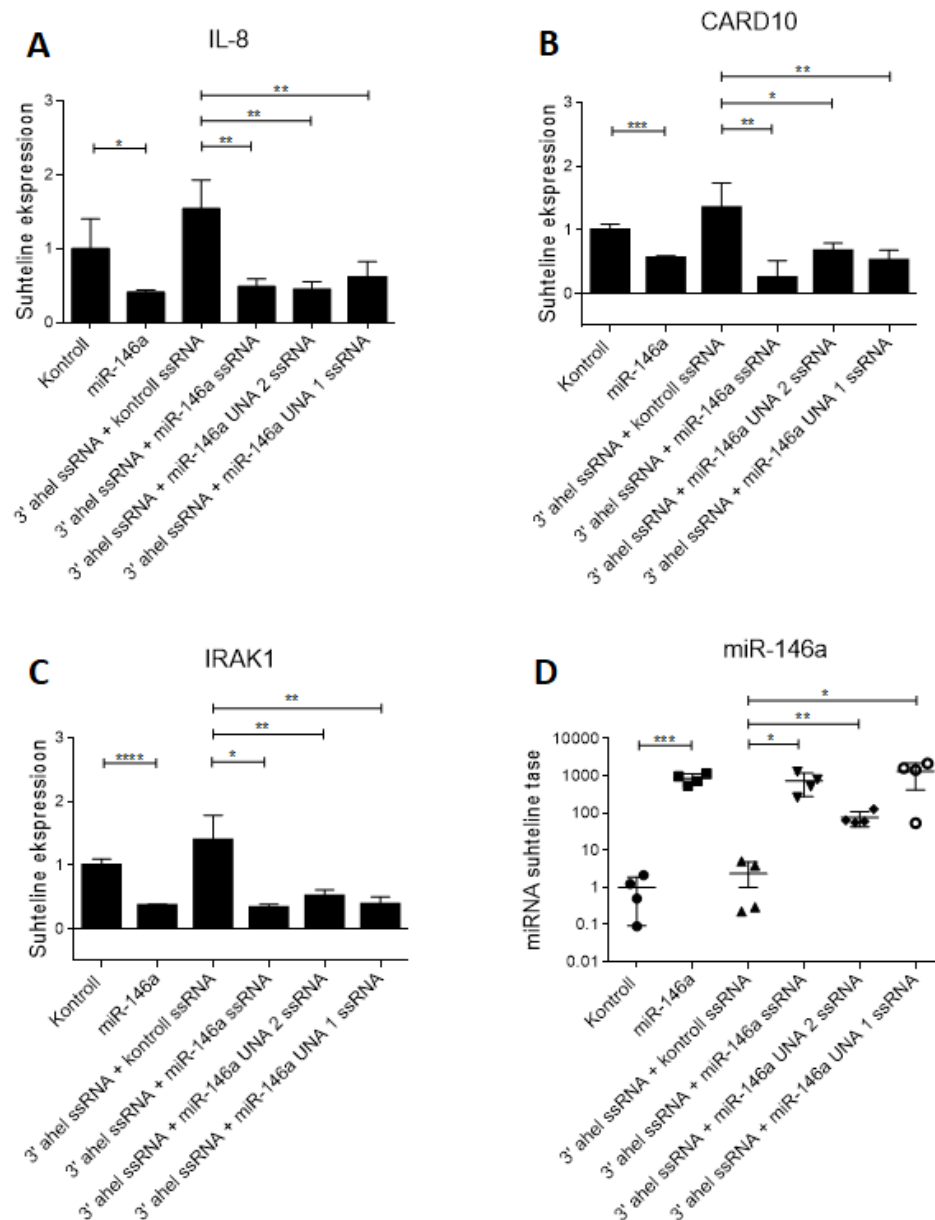


Joonis 9. miRNA-146a sihtmärkgeenide ekspressioon kommertsiaalsete ning erinevate miRNA-peptiid suhtega üheaahelaliste miR-146a miimidega transfekteerides. Inimese primaarseid keratinotsüüte transfekteeriti joonisel välja toodud miimidega. Transfektsioon kestis 24 tundi. Välja on toodud miRNA-peptiid suhtega 1:17 kaheaahelised kommertsiaalsed negatiivne kontroll ja miR-146a ning üheaahelalised 3' ssRNA ning ühe UNA monomeeriga miR-146a ahelad. Lisaks uuriti mRNA taset kahe üheaahelise miimi puhul ka suhte 1:10 ning 1:5 juures. mRNA tase rakkudes leiti RT-qPCR-i abil ning kolme sihtmärkgeeni puhul- IL8 (A), CARD10 (B) ning IRAK1 (C). Tulemused on normaliseeritud koduhoidja geeni EF1A suhtes. Joonisel 9D on näidatud miRNA tase kahe üheaahelise miimi puhul suhte 1:17, 1:10 ning 1:5 juures. miRNA tase rakkudes leiti RT-qPCR-i abil. Tulemused on normaliseeritud koduhoidja let-7a suhtes. Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi, veapiiridena esitatud SEM. N=3-4; * P < 0,05; ** P < 0,01; **** P < 0,0001.

2.3.4 Üheaahelaliste miR-146a miimide kokkusegamisel saadud kaheaahelalised miimid on keratinotsüütides funktsionaalsed

Järgmiseks sooviti uurida, kas Jesper Wengeli poolt sünteesitud miimid suudaksid funktsioneerida kaheaahelalistena. 3'-ahel on sünteesitud paarduma teiste üheaahelaliste miimidega. Üheaahelaliste miimide kokkusegamisel liitub 3'-ahel nii üheaahelalise kontrollahela, miR-146a ahela kui ka mõlema UNA modifikatsiooni sisaldava ahelaga. Võrdluseks toodi graafikutel välja ka kaheaahelalised kommertsiaalselt toodetud miR-146a ning selle negatiivne kontroll. IL-8 (joonis 10A) puhul esines statistiliselt oluline muutus ekspressioonitasemes võrreldes kommertsiaalseid miime - kontrolli ja miR-146a vahel esines $2,43 (\pm 0,2)$ kordne langus. IL-8 mRNA ekspressioonitase langes oluliselt ka võrreldes kokkusegatud kaheahelalist kontrollahelat teiste saadud kaheaahelaliste miimidega - 3'-ahelaga liidetud üheaahelalise miR-146a puhul $3,15 (\pm 0,2)$ korda, 3'-ahelaga liidetud kahe UNA monomeeriga ahela puhul $3,41 (\pm 0,2)$ korda ning 3'-ahelaga liidetud ühe UNA monomeeriga ahela puhul $2,53 (\pm 0,22)$ korda. CARD10 (joonis 10B) puhul vähenes mRNA ekspressioonitase kommertsiaalse kontrolli ning miR-146a miimi vahel $1,79 (\pm 0,05)$ korda. Võrreldes kaheaahelalist kontrolli 3'-ahelaga liidetud üheaahelalise miR-146a ahela ning 3'-ahelaga liidetud kahe ja ühe UNA modifikatsiooniga ahelatega esinesid ekspressioonitaseme langused vastavalt $5,39 (\pm 0,24)$ korda, $2,01 (\pm 0,20)$ korda ning $2,58 (\pm 0,21)$ korda. Joonisel 10C on näidatud, et IRAK1 puhul langes kommertsiaalse miR-146a tase võrreldes vastava kontrolliga $2,75 (\pm 0,048)$ korda. Statistiliselt olulisi langusi ekspressioonitasemetes esines ka võrreldes kokkusegatud kaheaahelalise kontrolli ekspressioonitaset 3'-ahelaga liidetud üheaahelalise miR-146a ahela ning 3'-ahelaga liidetud kahe ja ühe UNA modifikatsiooniga ahelatega- vastavalt $4,17 (\pm 0,29)$; $2,71 (\pm 0,2)$ ning $3,62 (\pm 0,20)$ kordsed langused.

Joonisel 10D on näidatud miRNA taset pärast transfektsiooni keratinotsüütidest eraldatud RNA proovides. Kommertsiaalse kontrollmiimiga ja miR-146a-ga transfekteritud keratinotsüütidest eraldatud totaalse RNA proovides esines $854,5 (\pm 138,8)$ kordne vahe miR-146a qPCRi prooviga mõõtes. Üheaahelalistest miimidest kokkusegatud kaheaahelaliste miimide puhul võrreldi 3'-ahela ja üheaahelalise kontrollahela segu ahelatega, mille puhul oli 3'-ahelale liidetud üheaahelaline miR-146a, kahe UNA monomeeriga ahel ning ühe UNA monomeeriga ahel. Iga võrdluse puhul leiti statistiliselt oluline tulemus: vastavalt $320,24 (\pm 225,2)$; $32,7 \pm (17,01)$ ning $565,72 (\pm 452)$ kordne tõus mikroRNA-d sisaldavate ahelate ekspressioonitasemetes. Kokkuvõtlikult saab öelda, et kaheaahelalised miimid sisenesid efektiivselt rakkudesse ning olid seal funktsionaalsed, surudes sihtmärkgeenide ekspressiooni alla.



Joonis 10. miRNA-146a sihtmärkgeenide ekspressioon kaheaheelaliste ja kommertsiaalsete miimidega transfekterimisel. Inimese primaarseid keratinotsüüte transfekteeeriti joonisel välja toodud miimidega. Transfektsioon kestis 24 tundi. Kasutati miime, kus oli 3'-ahel segatud kokku üheaheelalise kontrolli ahela (3'-ahel ssRNA + kontroll ssRNA), miR-146a ahela (3'-ahel ssRNA + 146a ssRNA) ning ühte (3'-ahel ssRNA + miR-146a UNA 1 ssRNA) või kahte (3'-ahel ssRNA + miR-146a UNA 2 ssRNA) UNA monomeeri sisaldava ahelaga. 10A, 10B, 10C- mRNA tase leiti RT-qPCR meetodi abil ning tulemused on normaliseeritud koduhoidja EF1A vastu. 10D- miRNA tase rakkudes leiti samuti RTqPCR-i abil. Statistiliseks analüüsiks kasutati T-testi, veapiiridena esitatud SEM. N=3-4; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

2.4 ARUTELU

MikroRNA miimid on asendamatud abivahendid mikroRNA-de funktsiooni uurimisel. Miimid jäljendavad endogeenseid miRNA-sid, omades sama järjestust ning reguleerides samade sihtmärkgeenide ekspressiooni (Li jt, 2014). Praegu toodetakse tööstuslikult teadaolevalt kaheaahelisi miime ning nende üheaaheliste analoogide potentsiaali on vähe uuritud. 2012 aastal näitasid Chorn jt, et nende katsetes jäid üheaahelised miimid funktsionaalsuselt kaheaahelistele alla. Käesolev uurimistöö kõrvutas omavahel transfektsiooni miR-146a ühe- ning kaheaaheliste miimidega ning sai sarnase tulemuse.

Kasutatud ühe- ja kaheaahelised miimid on sünteesitud eesmärgiga rakendada neid miime ja nende põhjal disainitud modifitseeritud analooge edaspidises teadus- ja arendustöös. Miimide süntees koostööpartnerite poolt välistas kommertsiaalselt toodetud miimide suure puuduse- kasutajatele ei avaldata miimide täpseid järjestusi või ahelates tehtud modifikatsioone, mis võivad põhjustada kõikumisi erinevate firmade poolt toodetud miimidega läbi viidud katsete tulemustes (Jin jt, 2015). Kaheaahelised miimid saadi liites omvahel kasutatud üheaahelised miimid, niisiis oli ka nende puhul ahelate täpne ülesehitus teada. Ainsa puudusena antud töös kasutatud miimide juures võib välja tuua selle, et 3'-ahelal, mis segati kokku teiste üheaaheliste miimidega, esines üheaahelise kontrolliga liitmisel kahenukleotiidine erinevus, mistõttu ei olnud tegemist ideaalse kontrolliga.

Rakku sisenevad peptiidid on molekulide rakkudesse kandjana olnud kasutusel juba aastast 1994 (Derossi jt, 1994). RSP-d on osutunud efektiivseteks kandjateks väga erinevat tüüpi ja erineva suurusega molekulidele. Antud töös viidi miR-146a kaheaahelalist miimi ja vastavat kontrolli keratinotsüütidesse viie erineva peptiidiga: PepFect14, C-12-14, C-22-14, NickFect55 ning NickFect70. Toodud peptiididest oli varasemalt mikroRNA transfektsiooniks kasutatud vaid PF14 (Urgard jt, 2017). C-12-14 ning C-22-14 valiti antud töösse, kuna need on PF14 modifitseeritud analoogid, mis saadi, kui PF14 ahelale lisati vastavalt 12 ja 22 süsinikuga küllastunud lineaarseid atsüülahelaid (Lehto jt, 2017). NickFectidega on varasemalt näidatud edukaid pDNA ning siRNA transfektsioone (Arukuusk jt, 2013) ning antud töös sooviti selgitada, kas need sobiksid ka miRNA-de transpordiks. Sihtmärkgeenidena vaadeldi tuntud miR-146a sihtmärke IL-8, CARD10 ning IRAK1. Tulemustest selgus, et kõikide kasutatud peptiididega on võimalik edukalt mikroRNA-d keratinotsüütidesse transportida. Ainus negatiivne aspekt ilmnas IL-8 kõrges ekspressioonitasemes transfektsioonil C-12-14-ga. Kuna IL-8 toimib organismis immuunsüsteemi aktiveerijana (Rebane jt, 2014), siis tuleks selle ekspressiooni tõusu vältida.

Rakku sisenevaid peptiide katsetati antud töös NHEK (*normal human epidermal keratinocytes*) rakuliinil. Tulemused keratinotsüütidega olid paljulubavad ning näitasid, et kõik kasutatud peptiidid suudavad mikroRNA-sid edukalt rakkudesse viia. See annab alust tulevikus katsetada mikroRNA sisestamist ka teistesse rakuliinidesse, kasutades samu rakku sisenevaid peptiide.

Esimesest katsest üheaahelaliste miimidega tuli välja, et need on väheefektiivsed. Miimid ei põhjustanud uuritud sihtmärkgeenides kommertsiaalsete mikroRNA miimidega sarnaseid muutusi geeniekspressioonis. MikroRNA-de biogeneesi käigus moodustub pärast pre-miRNA lõikamist Diceriga kaheaahelaline kompleks, mis seondub valguga Ago2. Ago2 algatab kompleksi lõhkumise, mille käigus üks ahel lagundatakse ja allesjäänud juhtahel seondub sihtmärk mRNA 3' UTR-ga oma seemnejärjestuse abil (Bartel, 2009; Kim jt, 2009). Seda, et Ago2 valk seob looduslikult vaid kaheaahelalisi RNA-sid, ongi peetud põhjuseks, miks üheaahelalised miimid ei ole rakkudes võrdväärse funktsionaalsusega ning miks neid üritatakse keemiliste modifikatsioonide abil muuta efektiivsemaks (Chorn jt, 2012). Kinnitamaks, et üheaahelalised miimid sisenesid rakkudesse, viidi mikroRNA taseme hindamiseks läbi RT-qPCR, mis näitas miRNA olemasolu keratinotsüütides.

Kõige tugevamat efekti CARD10 ning IRAK1 allareguleerimisel omas üheaahelalistest miimidest ühe UNA monomeeriga miim. Võib eeldada, et kuna kahe UNA monomeeriga ahel on paindlikum, siis antud miimi puhul toimub mRNA-ga nõrgem seondumine, kui ühe monomeeriga miimi puhul, ning seetõttu ei ole antud ahel funktsionaalne. miRNA-peptiidi suhe 1:17 oli optimeeritud kaheaahelaliste miimide transfektsiooniks, niisiis tehti lisaks ka katseid kolme erineva miRNA-peptiid suhte juures. Sellega sooviti välja selgitada, kas üheaahelalised miimid vajavad efektiivseks toimimiseks teistsuguse miRNA-peptiid suhtega transfektsioonisegu. Peptiidi kogust transfektsioonisegus vähendati kuni miRNA-peptiid molaarsete suhete 1:10 ning 1:5, kuid ka nendel suhetel ei toimunud efektiivset sihtmärkgeenide ekspressiooni inhibeerimist.

Kaheaahelaliste miimidega transfekterides vaadeldi samu sihtmärkgeene, mis üheaahelalistega - IL-8, CARD10 ja IRAK1 ning leiti, et kaheaahelalised koostööpartnerite poolt sünteesitud miimid olid sarnaselt kommertsiaalsete miimidega efektiivsed sihtmärkgeenide ekspressiooni pärssimisel. RT-qPCR-i abil näidati, et ka üheaahelalisi miime segades saadud kaheaahelaliste miimidega transfekterimisel suudeti sisestada mikroRNA keratinotsüütidesse.

Kokkuvõttes leiti, et modifitseerimata üheaahelalised miimid ei toimi rakkudes sarnaselt kommertsiaalsetele miRNA miimidele. Antud töös kasutati lisaks modifitseerimata RNA ahelatele ka UNA modifikatsiooniga ahelaid, mis on paindlikumad kui modifitseerimata RNA

ahelad. See muutus aga ei parandanud ühe- ega kaheaahelaliste miimide funktsionaalsust rakus. Üheaahelaliste miimide struktuuri ja nende rakkudesse transpordi arendamist tuleks kindlasti jätkata, kuna õnnestunud tulemuste saavutamise mugavdaks miRNA miimide kasutamist - üheaahelaliste miimide tootmine kaheaahelaliste asemel tähendaks nende kiiremat valmimist, lihtsamat sünteesiprotsessi ning odavamalt hinda.

KOKKUVÕTE

Rakku sisenevad peptiidid on ühendid, mis sisenevad ise ja suudavad erineva struktuuri ning suurusega molekule efektiivselt kanda mitmetesse rakuliinidesse. Erinevate RSP-dega on rakkudesse sisestatud mitut eri tüüpi molekule, kaasaarvatud mikroRNA miime. Antud töös kasutatud peptiidide seast on miRNA miime transporditud vaid PF14-ga (Urgard jt, 2017). Käesolevas bakalaureusetöös kasutati miRNA miimide keratinotsüütidesse transportimiseks viit erinevat rakku sisenevat peptiidi - PF14, NF55, NF70, C-22-14 ning C-12-14. Spetsiifiliste miimidenä kasutati miR-146a miime, mille bioloogiline funktsioon on varem näidatud. Miimide funktsionaalsuse hindamiseks mõõdeti miR-146a sihtmärkgeenide IL8, CARD10 ja IRAK1 mRNA ekspressiooni tasemeid RT-qPCR abil. Kõik katsetesse võetud peptiidid transportisid miRNA miime efektiivselt rakkudesse. Võrreldes teiste kasutatud peptiididega oli vähem efektiivne C-12-14, mille puhul ei esinenud statistiliselt olulisi muutusi IL-8, CARD10 ning vastavate kontrollide ekspressioonitasemetes. Samuti põhjustas peptiid C-12-14 IL-8 ekspressiooni 29,05 kordse tõusu.

MikroRNA-d on lühikesed endogeensed mittekodeerivad RNA-d, mis vastutavad komplementaarsete mRNA-de transkriptsioonijärgse regulatsiooni eest (Lau jt, 2001). MikroRNA miime kasutatakse, et uurida endogeensete miRNA-de funktsioone organismis. Tööstuslikus tootmises olevad miimid on enamasti kaheaahelalised, kuid nende täpset järjestust, pikkust ning modifikatsioone ei avaldata kasutajatele. Teadus- ja arendustöös, kus on vajalik teada miimi täpset molekulaarset struktuuri, ei ole sellised miimid kasutatavad. Samuti on vähe uuritud üheaahelaliste miimide toimimist rakkudes. Antud bakalaureusetöös katsetati Jesper Wengeli poolt sünteesitud viit üheaahelalist miRNA miimi. Kolm nendest olid sünteesitud tavalise RNA ahelana, kahele oli lisatud vastavalt üks või kaks UNA monomeeri. Ahelaid transfekteriti keratinotsüütidesse rakku siseneva peptiidi PF14 abil. mRNA ekspressiooni muutuste põhjal leiti, et üheaahelalised miimid ei käitu rakkudes sarnaselt kommertsiaalsete miR-146a miimidega, kuid RT-qPCR analüüs miRNA tasemete leidmiseks kinnitas, et miimid sisenesid rakkudesse.

Kõige edukamalt toimis sihtmärkgeenide ekspressiooni inhibeerimisel üheaahelaline miim, millele oli lisatud üks UNA monomeer. Nimetatud miimi transfektsiooniks kasutati kolme erinevat mikroRNA-peptiidi suhet, kuid selle tulemusena ei saavutatud suuremat mõju sihtmärkgeenidele.

Järgnevalt segati olemasolevad üheaahelalised miimid kokku, liites 3'-ahela iga teise ahelaga. Saadi kaheaahelalised miimid, mis põhjustasid rakkudes ekspressioonitasemete muutusi sarnaselt kommertsiaalsetele miimidele.

Käesoleva bakalaureusetöö käigus selgitati välja, et peptiidide PF14, NF55, NF70, C-12-14 ning C-22-14 abil on võimalik mikroRNA miime transportida inimese primaarsetesse keratinotsüütidesse. Samuti tõestati, et kaheaahelalised UNA nukleotiidi sisaldavad miRNA miimid on kasutavad edasises teadus- ja arendustöös ja on bioloogiliselt efektiivsemad võrreldes üheaahelaliste miRNA miimidega.

Developing of the microRNA transfection method based on cell penetrating peptides

Karolina Laas-Dobrevá

Summary

Cell-penetrating peptides are molecules that can enter through cell membranes into the cells and transport different types and sizes of cargo into multiple cell types (Milletti, 2012). MicroRNAs are small (21-23 nucleotides in length) non-coding endogenous RNAs that regulate the translation of mRNA into proteins by binding with complementary mRNAs (Lau et al, 2001). MiRNA mimics are artificial copies of endogenous microRNAs that enable us to investigate the functioning of different miRNAs in living organisms. Commercially produced and sold miRNA mimics are double-stranded, the effects of single-stranded mimics have not been widely studied. Previous to this thesis, the only peptide used for miRNA mimic transfection had been PepFect14. The goal of this thesis was to analyze the functionality of single stranded mimics in keratinocytes. In addition, single stranded mimics were mixed together to create double-stranded mimics in order to see, whether they enter the cells and function similarly to commercially used miRNAs. Double-stranded mimics were carried into the cells with five different cell-penetrating peptides to see, if any of those could be as effective as PepFect14.

In the given thesis, five different cell penetrating peptides- PepFect14, NickFect55, NickFect70, C-12-14 and C-22-14 were used to transport commercial double stranded miRNA-146a mimics into keratinocytes. The aim of this experiment was to find the most effective peptide to use for the transfection of mimics. All but one of these peptides showed results as good as had been previously achieved with PepFect14. The only peptide slightly less effective than the others was C-12-14, as the transfection resulted in a steep rise in mRNA levels of IL-8, which acts as an activator of the immune system in organisms (Rebane et al, 2014).

Five different single-stranded microRNA-146a mimics, synthesized by Jesper Wengel, were taken into keratinocytes and the changes in gene expression of known miR-146a target genes IL-8, CARD10 and IRAK1 were analyzed. Three of these mimics had an RNA structure, but two had either one or two UNA molecules added. None of the used single-stranded molecules showed functioning similar to endogenous miR-146a in the cells. The transfection mix used to insert the mimics into cells had miRNA-peptide ratio of 1:17. Since this is the ratio normally used for transfecting double-stranded mimics, it was changed in the hope of finding an optimal miRNA-peptide ratio for effective transfection of single-stranded mimics. The amount of

peptide was decreased until the ratios were 1:10 and 1:5. The most effective strand from the first experiment, mimic with a single UNA monomer, was chosen to use in a new study using different ratios. As a control, the 3'-strand from the first experiment was used. The results showed that changing the miRNA-peptide ratio did not improve the effectiveness of single-stranded mimics. Even though their presence in cells was detected using RT-qPCR, they did not function as expected.

Next, the 3'-single stranded mimic was mixed with each of the other single-stranded mimics to create double-stranded mimics. Their entering into cells and functioning was analyzed using the same target genes as before. This time, the results were positive as the transfection with double-stranded mimics showed changes in gene expression that were similar to endogenous miRNAs.

To sum up, this thesis showed that even though single-stranded microRNA mimics enter keratinocytes, they are not functional in the cells. Their effectiveness did not improve neither by adding unlocked nucleic acid monomers into the mimics nor by changing the peptide-miRNA ratio in the transfection mix. However, the double-stranded mimics, created by mixing the single-stranded mimics together, showed functionality in the cells. This thesis also tested five different cell-penetrating peptides, only one of which had previously been used to transfect miRNA mimics, and found out that all of those peptides worked effectively.

TÄNUSÕNAD

Eelkõige sooviksin tänada oma juhendajaid Helen Hermanni, Toomas Runnelit ning Toivo Maimetsa. Minu suurimad tänusõnad lähevad Helen Hermannile, kes aitas mind nii eksperimentaalselt kui ka uurimistöö kirjutamisel ja vormistamisel. Samuti tänan kõiki RNA bioloogia töörühma liikmeid, eriti Ana Rebast, Egon Urgardi, Anet Kivihalli ning Gemma Carreras Badosat, kes on mind aidanud kõikide jooksvate küsimuste lahendamisel.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Al-Dosari, M. S., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4), 671.
- Andre, F. M., Cournil-Henrionnet, C., Vernerey, D., Opolon, P., & Mir, L. M. (2006). Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene therapy*, 13(23), 1619.
- Arukuusk, P., Pärnaste, L., Hällbrink, M., & Langel, Ü. (2015). PepFects and NickFects for the intracellular delivery of nucleic acids. In *Cell-Penetrating Peptides* (pp. 303-315). Humana Press, New York, NY.
- Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolovici, D. M., Margus, H., Padari, K., ... & Tover, A. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(5), 1365-1373.
- Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E., & Bartel, D. P. (2013). Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*, 152(4), 844-858.
- Baek, D., Villén, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P., & Bartel, D. P. (2008). The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455(7209), 64.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363.
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & GÖRLICH, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*, 10(2), 185-191.
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., ... & Sun, G. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20101823.
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., ... & Sun, G. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*, jem-20101823.
- Bouchie, A. (2013). First microRNA mimic enters clinic.
- Bramsen, J. B., Pakula, M. M., Hansen, T. B., Bus, C., Langkjær, N., Odadzic, D., ... & Herdewijn, P. (2010). A screen of chemical modifications identifies position-specific modification by UNA to most potently reduce siRNA off-target effects. *Nucleic acids research*, 38(17), 5761-5773.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10(12), 1957-1966.
- Chesnoy, S., & Huang, L. (2000). Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29(1), 27-47.
- Cho, Y. W., Kim, J. D., & Park, K. (2003). Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(6), 721-734.

- Chorn, G., Klein-McDowell, M., Zhao, L., Saunders, M. A., Flanagan, W. M., Willingham, A. T., & Lim, L. P. (2012). Single-stranded microRNA mimics. *RNA*, *18*(10), 1796-1804.
- Crombez, L., Aldrian-Herrada, G., Konate, K., Nguyen, Q. N., McMaster, G. K., Brasseur, R., ... & Divita, G. (2009). A new potent secondary amphipathic cell-penetrating peptide for siRNA delivery into mammalian cells. *Molecular therapy*, *17*(1), 95-103.
- Crone, S. G., Jacobsen, A., Federspiel, B., Bardram, L., Krogh, A., Lund, A. H., & Friis-Hansen, L. (2012). microRNA-146a inhibits G protein-coupled receptor-mediated activation of NF- κ B by targeting CARD10 and COPS8 in gastric cancer. *Molecular cancer*, *11*(1), 71.
- Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). Biogenesis and function of ago-associated RNAs. *Trends in Genetics*, *33*(3), 208-219.
- Davis, M. E., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery*, *7*(9), 771.
- de Ilarduya, C. T., Sun, Y., & Düzgüneş, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European journal of pharmaceutical sciences*, *40*(3), 159-170.
- Denli, A. M., Tops, B. B., Plasterk, R. H., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, *432*(7014), 231.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., & Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(14), 10444-10450.
- Eastman, S. J., Siegel, C. T. J. S. A. E. C. S. H. R. K., Tousignant, J., Smith, A. E., Cheng, S. H., & Scheule, R. K. (1997). Biophysical characterization of cationic lipid: DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1325*(1), 41-62.
- Eichhorn, S. W., Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., ... & Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*, *56*(1), 104-115.
- El-Armouche, A., Singh, J., Naito, H., Wittköpper, K., Didié, M., Laatsch, A., ... & Eschenhagen, T. (2007). Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKC α improves contractile function in reconstituted heart tissue. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *43*(3), 371-376.
- El-Armouche, A., Singh, J., Naito, H., Wittköpper, K., Didié, M., Laatsch, A., ... & Eschenhagen, T. (2007). Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKC α improves contractile function in reconstituted heart tissue. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *43*(3), 371-376.
- El-Sayed, A., Futaki, S., & Harashima, H. (2009). Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: ways to overcome endosomal entrapment. *The AAPS journal*, *11*(1), 13-22.
- ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, *489*(7414), 57.

- Ezzat, K., EL Andaloussi, S., Zaghloul, E. M., Lehto, T., Lindberg, S., Moreno, P. M., ... & Sillard, R. (2011). PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic acids research*, 39(12), 5284-5298.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... & Danielsen, M. (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
- Frankel, A. D., & Pabo, C. O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*, 55(6), 1189-1193.
- Freimann, K., Arukuusk, P., Kurrikoff, K., Vasconcelos, L. D. F., Veiman, K. L., Uusna, J., ... & Langel, Ü. (2016). Optimization of in vivo DNA delivery with NickFect peptide vectors. *Journal of Controlled Release*, 241, 135-143.
- Funahashi, J. I., Okafuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H., & Nakamura, H. (1999). Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Development, growth & differentiation*, 41(1), 59-72.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *Journal of Biological Chemistry*, 276(8), 5836-5840.
- Gao 2007- Gao, X., Kim, K. S., & Liu, D. (2007). Nonviral gene delivery: what we know and what is next. *The AAPS journal*, 9(1), E92-E104
- Gershon, H., Ghirlando, R., Guttman, S. B., & Minsky, A. (1993). Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochemistry*, 32(28), 7143-7151.
- Green, M., Ishino, M., & Loewenstein, P. M. (1989). Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell*, 58(1), 215-223.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4), 631-640.
- Guterstam, P., Madani, F., Hirose, H., Takeuchi, T., Futaki, S., Andaloussi, S. E., ... & Langel, Ü. (2009). Elucidating cell-penetrating peptide mechanisms of action for membrane interaction, cellular uptake, and translocation utilizing the hydrophobic counter-anion pyrenebutyrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788(12), 2509-2517.
- He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522.
- Heller, L. C., Ugen, K., & Heller, R. (2005). Electroporation for targeted gene transfer. *Expert opinion on drug delivery*, 2(2), 255-268.

- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 99.
- Isaka, Y., & Imai, E. (2007). Electroporation-mediated gene therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 4(5), 561-571.
- Ivanova, E. A., Maslov, M. A., Kabilova, T. O., Puchkov, P. A., Alekseeva, A. S., Boldyrev, I. A., ... & Zenkova, M. A. (2013). Structure–transfection activity relationships in a series of novel cationic lipids with heterocyclic head-groups. *Organic & biomolecular chemistry*, 11(41), 7164-7178.
- Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular cell*, 39(2), 292-299.
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. V., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., ... & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Frontiers in genetics*, 6, 340.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., & Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 1864-1868.
- Järver, P., & Langel, Ü. (2004). The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug discovery today*, 9(9), 395-402.
- Kaestner, L., Scholz, A., & Lipp, P. (2015). Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(6), 1171-1176.
- Kaestner, L., Scholz, A., Tian, Q., Ruppenthal, S., Tabellion, W., Wiesen, K., ... & Lipp, P. (2014). Genetically encoded Ca²⁺ indicators in cardiac myocytes. *Circulation research*, 114(10), 1623-1639.
- Kastner, E., Kaur, R., Lowry, D., Moghaddam, B., Wilkinson, A., & Perrie, Y. (2014). High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2), 361-368.
- Kingston, P. A., Sinha, S., David, A., Castro, M. G., Lowenstein, P. R., & Heagerty, A. M. (2001). Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor- β type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. *Circulation*, 104(21), 2595-2601.
- Koch, G. (1973). Interaction of poliovirus-specific RNAs with HeLa cells and E. coli. In *Current Topics in Microbiology and Immunology/Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung* (pp. 89-138). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Koren, E., & Torchilin, V. P. (2012). Cell-penetrating peptides: breaking through to the other side. *Trends in molecular medicine*, 18(7), 385-393. !!
- Kreiss, P., Mailhe, P., Scherman, D., Pitard, B., Cameron, B., Rangara, R., ... & Crouzet, J. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic acids research*, 27(19), 3792-3798.

- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597.
- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nature Structural and Molecular Biology*, 19(2), 145.
- Langkjær, N., Pasternak, A., & Wengel, J. (2009). UNA (unlocked nucleic acid): a flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(15), 5420-5425.
- Larjava, H., Plow, E. F., & Wu, C. (2008). Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell–matrix adhesion. *EMBO reports*, 9(12), 1203-1208.
- Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., & Bartel, D. P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), 858-862.
- Lawrie, A., Briskin, A. F., Francis, S. E., Cumberland, D. C., Crossman, D. C., & Newman, C. M. (2000). Microbubble-enhanced ultrasound for vascular gene delivery. *Gene therapy*, 7(23), 2023.
- Lee, Y. S., Nakahara, K., Pham, J. W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E. J., & Carthew, R. W. (2004). Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *cell*, 117(1), 69-81.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415.
- Lehto, T., Vasconcelos, L., Margus, H., Figueroa, R., Pooga, M., Hällbrink, M., & Langel, U. (2017). Saturated Fatty Acid Analogues of Cell-Penetrating Peptide PepFect14: Role of Fatty Acid Modification in Complexation and Delivery of Splice-Correcting Oligonucleotides. *Bioconjugate chemistry*, 28(3), 782-792.
- Li, N., Long, B., Han, W., Yuan, S., & Wang, K. (2017). microRNAs: important regulators of stem cells. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 110.
- Li, Z., & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature reviews Drug discovery*, 13(8), 622.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... & Downing, J. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *nature*, 435(7043), 834.
- Lu, L. F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L. L., Taganov, K. D., Hanada, T., ... & Rudensky, A. Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, 142(6), 914-929.
- Lu, L. F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L. L., Taganov, K. D., Hanada, T., ... & Rudensky, A. Y. (2010). Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell*, 142(6), 914-929.
- Ma, B., Zhang, S., Jiang, H., Zhao, B., & Lv, H. (2007). Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 123(3), 184-194.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., & Gräslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of Biophysics*, 2011.

- Malone, R. W., Felgner, P. L., & Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6077-6081.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R., & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 110(5), 563-574.
- Meisgen, F., Landén, N. X., Wang, A., Réthi, B., Bouez, C., Zuccolo, M., ... & Pivarcsi, A. (2014). MiR-146a negatively regulates TLR2-induced inflammatory responses in keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(7), 1931-1940.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular cell*, 15(2), 185-197.
- Milletti, F. (2012). Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug discovery today*, 17(15-16), 850-860.
- Mäe, M., & Langel, Ü. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Current opinion in pharmacology*, 6(5), 509-514.
- Nguyen, T. A., Jo, M. H., Choi, Y. G., Park, J., Kwon, S. C., Hohng, S., ... & Woo, J. S. (2015). Functional anatomy of the human microprocessor. *Cell*, 161(6), 1374-1387.
- Niculescu-Duvaz, D., Heyes, J., & Springer, C. J. (2003). Structure-activity relationship in cationic lipid mediated gene transfection. *Current medicinal chemistry*, 10(14), 1233-1261.
- Nielsen, P., Dreijøe, L. H., & Wengel, J. (1995). Synthesis and evaluation of oligodeoxynucleotides containing acyclic nucleosides: introduction of three novel analogues and a summary. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 3(1), 19-28.
- Ogłęcka, K., Lundberg, P., Magzoub, M., Eriksson, L. G., Langel, Ü., & Gräslund, A. (2008). Relevance of the N-terminal NLS-like sequence of the prion protein for membrane perturbation effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1778(1), 206-213.
- Oskolkov, N., Arukuusk, P., Copolovici, D. M., Lindberg, S., Margus, H., Padari, K., ... & Langel, Ü. (2011). NickFects, phosphorylated derivatives of transportan 10 for cellular delivery of oligonucleotides. *International journal of peptide research and therapeutics*, 17(2), 147.
- Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: what is functional and what is junk?. *Frontiers in genetics*, 6, 2.
- Pasternak, A., & Wengel, J. (2010). Thermodynamics of RNA duplexes modified with unlocked nucleic acid nucleotides. *Nucleic acids research*, 38(19), 6697-6706.
- Pector, V., Backmann, J., Maes, D., Vandenbranden, M., & Ruyschaert, J. M. (2000). Biophysical and Structural Properties of DNA· diC14-amidine Complexes INFLUENCE OF THE DNA/LIPID RATIO. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29533-29538.
- Rebane, A., Runnel, T., Aab, A., Maslovskaja, J., Rückert, B., Zimmermann, M., ... & Haljasorg, U. (2014). MicroRNA-146a alleviates chronic skin inflammation in atopic dermatitis through suppression of innate immune responses in keratinocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(4), 836-847.

- Reid, G., Kao, S. C., Pavlakis, N., Brahmabhatt, H., MacDiarmid, J., Clarke, S., ... & van Zandwijk, N. (2016). Clinical development of TargomiRs, a miRNA mimic-based treatment for patients with recurrent thoracic cancer. *Epigenomics*, 8(8), 1079-1085.
- Rupaimoole, R., & Slack, F. (2017). Identification of miR-34 Synergistic Small Molecule Inhibitor for Therapy Against NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology*, 12(8), S1542.
- Scheller, A., Oehlke, J., Wiesner, B., Dathe, M., Krause, E., Beyermann, M., ... & Bienert, M. (1999). Structural requirements for cellular uptake of α -helical amphipathic peptides. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 5(4), 185-194.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Haley, B., & Zamore, P. D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Molecular cell*, 10(3), 537-548.
- Segura, T., & Shea, L. D. (2001). Materials for non-viral gene delivery. *Annual Review of Materials Research*, 31(1), 25-46.
- Shcharbin, D., Shakhbazau, A., & Bryszewska, M. (2013). Poly (amidoamine) dendrimer complexes as a platform for gene delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 10(12), 1687-1698.
- Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2011). MicroRNAs in inflammation and response to injuries induced by environmental pollution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1), 46-53.
- Srivastava, A., Nikamo, P., Lohcharoenkal, W., Li, D., Meisgen, F., Landén, N. X., ... & Sonkoly, E. (2017). MicroRNA-146a suppresses IL-17-mediated skin inflammation and is genetically associated with psoriasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(2), 550-561.
- Stewart, K. M., Horton, K. L., & Kelley, S. O. (2008). Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & biomolecular chemistry*, 6(13), 2242-2255.
- Zhang, W., Yi, X., Guo, S., Shi, Q., Wei, C., Li, X., ... & Li, C. (2014). A single-nucleotide polymorphism of miR-146a and psoriasis: an association and functional study. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(11), 2225-2234.
- Zhdanov, R. I., Podobed, O. V., & Vlassov, V. V. (2002). Cationic lipid-DNA complexes—lipoplexes—for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry*, 58(1), 53-64.
- Zhu, K., Pan, Q., Zhang, X., Kong, L. Q., Fan, J., Dai, Z., ... & Zhao, Y. M. (2013). MiR-146a enhances angiogenic activity of endothelial cells in hepatocellular carcinoma by promoting PDGFRA expression. *Carcinogenesis*, 34(9), 2071-2079.
- Ziegler, A. (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Advanced drug delivery reviews*, 60(4-5), 580-597.
- Zorko, M., & Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 57(4), 529-545.
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12481-12486.

- Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., Guo, Y., ... & Chen, S. (2009). MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis & Rheumatology*, 60(4), 1065-1075.
- Tavernier, G., Andries, O., Demeester, J., Sanders, N. N., De Smedt, S. C., & Rejman, J. (2011). mRNA as gene therapeutic: how to control protein expression. *Journal of controlled release*, 150(3), 238-247.
- Thomas, M., & Klibanov, A. M. (2003). Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied microbiology and biotechnology*, 62(1), 27-34.
- Tünnemann, G., Ter-Avetisyan, G., Martin, R. M., Stöckl, M., Herrmann, A., & Cardoso, M. C. (2008). Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *Journal of Peptide Science*, 14(4), 469-476.
- Urgard, E., Brjalin, A., Langel, Ü., Pooga, M., Rebane, A., & Annilo, T. (2017). Comparison of peptide- and lipid-based delivery of miR-34a-5p mimic into ppc-1 cells. *Nucleic acid therapeutics*, 27(5), 295-302.
- Urgard, E., Lorents, A., Klaas, M., Padari, K., Viil, J., Runnel, T., ... & Maimets, T. (2016). Pre-administration of PepFect6-microRNA-146a nanocomplexes inhibits inflammatory responses in keratinocytes and in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of Controlled Release*, 235, 195-204.
- Walther, W., & Stein, U. (2000). Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 60(2), 249-271.
- van Asbeck, A. H., Beyerle, A., McNeill, H., Bovee-Geurts, P. H., Lindberg, S., Verdurmen, W. P., ... & Brock, R. (2013). Molecular parameters of siRNA-cell penetrating peptide nanocomplexes for efficient cellular delivery. *ACS nano*, 7(5), 3797-3807.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., ... & Berneman, Z. N. (2001). Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood*, 98(1), 49-56.
- Wang, F., Wang, Y., Zhang, X., Zhang, W., Guo, S., & Jin, F. (2014). Recent progress of cell-penetrating peptides as new carriers for intracellular cargo delivery. *Journal of Controlled Release*, 174, 126-136.
- Wang, W., Li, W., Ma, N., & Steinhoff, G. (2013). Non-viral gene delivery methods. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(1), 46-60.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 36(1), 1-22.
- Watkins, C. L., Brennan, P., Fegan, C., Takayama, K., Nakase, I., Futaki, S., & Jones, A. T. (2009). Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *Journal of Controlled Release*, 140(3), 237-244.
- Verdurmen, W. P., & Brock, R. (2011). Biological responses towards cationic peptides and drug carriers. *Trends in pharmacological sciences*, 32(2), 116-124.

Villemeijane, J., & Mir, L. M. (2009). Physical methods of nucleic acid transfer: general concepts and applications. *British journal of pharmacology*, 157(2), 207-219.

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3), 228.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247(4949), 1465-1468.

Yandek, L. E., Pokorny, A., Florén, A., Knoelke, K., Langel, Ü., & Almeida, P. F. (2007). Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophysical journal*, 92(7), 2434-2444.

Yang, N. S., & Sun, W. H. (1995). Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy. *Nature medicine*, 1(5), 481-483.

Kasutatud veebiaadressid

miR-146a järjestus, miRBase andmebaas, külastatud 29.04.18,

http://www.mirbase.org/cgi-bin/get_seq.pl?acc=MIMAT0000449

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Karolina Laas-Dobrevä

(sünnikuupäev: 10.08.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Rakku sisenevatel peptiididel põhineva mikroRNA transfektsioonimeetodi arendamine“,

mille juhendaja on Helen Hermann, Toomas Runnel ja Toivo Maimets

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 10.05.2018